Einbau radioaktiver Vorstufen in Arthrobactin (Terregens - Faktor) bei Arthrobacter pascens und die Regulation der Lysindecarboxylase - Aktivität durch Eisen (III) - Ionen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

MARION SCHAFFT

aus Bad Hersfeld

1977

Einbau radioaktiver Vorstufen in Arthrobactin (Terregens - Faktor) bei Arthrobacter pascens und die Regulation der Lysindecarboxylase - Aktivität durch Eisen (III) - Ionen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

MARION SCHAFFT

aus Bad Hersfeld

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Februar 1977

Dekan: Professor Dr. D. Ammermann
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Diekmann
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Zähner

Gesamtherstellung: aKu–Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Meinen Eltern

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Diekmann am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I, der Universität Tübingen und am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität Hannover durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und viele wertvolle Diskussionen möchte ich Herrn Professor Dr. Diekmann danken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0056

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ATCC	American Type Culture Collection
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatographie
DE	Dünnschichtelektrophorese
dpm	desintegrations per minute
DTT	Dithiotreitol
ETH	Stammsammlung der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich
Min	Minute(n)
POPOP	2,2'-p-Phenylenbis (5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
Std	Stunde(n)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTC	2,3,5 - Triphenyltetrazoliumchlorid
UpM	Umdrehungen pro Minute
µCi	µ-Curie

INHALTSVERZEICHNIS Seite

1. EINLEITUNG 1

2. MATERIAL UND METHODEN 11
2.1. Reagenzien 11
2.2. Laufmittel und Puffer 13
2.3. Mikroorganismen 13
2.4. Nährmedien 14
2.5. Kulturbedingungen 18
2.6. Nachweis der Sideramine 19
2.7. Isolierung der Sideramine 19
2.8. Reinigung der Sideramine 20
2.9. Messung der Radioaktivität 21
2.10. Nachweis und Bestimmung von Aminosäuren 21
2.11. Herstellung radioaktiver Vorstufen 22
2.12. Einbau radioaktiver Vorstufen in vivo 23
2.13. Hydrolyse von Desferri-[^{14}C]-arthrobactin 24
2.14. Identifizierung der Hydrolyseprodukte des Arthrobactins 25
2.15. Proteinbestimmung 26
2.16. Ultraschallaufschluß 26
2.17. Transport markierter Citronensäure 27
2.18. Nachweis der Lysindecarboxylase-Aktivität 27
2.19. Bestimmung von Eisen(III)-ionen 29
2.20. Trockengewichtsbestimmung 29

3. ERGEBNISSE 30
3.1. Versuche mit Lysin und dessen Derivaten 30
3.1.1. In vivo Einbau mit Arthrobacter pascens 30

Seite

3.1.2. Nachweis von Intermediärprodukten der Arthrobactin-Biosynthese 37
3.1.3. In vivo Einbau mit Streptomyces glaucescens 47
3.2. Versuche mit Citronensäure und Bernsteinsäure 51
3.2.1. In vivo Einbau von Citronensäure mit Arthrobactin 51
3.2.2. Wachstum von Arthrobacter pascens auf Citrat als einziger C-Quelle 52
3.2.3. Transport von Citronensäure in Arthrobacter pascens vor und nach Induktion durch Citrat 53
3.2.4. Wachstum von Klebsiella pneumoniae auf Citrat als einziger C-Quelle 55
3.2.5. In vivo Einbau von Bernsteinsäure in Ferrioxamin E 57
3.3. Bestimmung der Lysindecarboxylase-Aktivität 59
3.3.1. In vivo Versuche mit Arthrobacter pascens, Streptomyces glaucescens, Klebsiella pneumoniae 59
3.3.2. In vitro Versuche mit Arthrobacter pascens 62
3.3.3. Vergleich des Einflusses von Eisen(III)-ionen auf die Lysindecarboxylase-Aktivität in vivo und in vitro 68

4. DISKUSSION 72

5. ZUSAMMENFASSUNG 83

6. LITERATUR 85

1. EINLEITUNG

Mikroorganismen besitzen spezifische Transportsysteme, die eine Versorgung der Zellen mit Molekülen oder Ionen gewährleisten.
Osterhout (1933) stellte eine Überlegung an, nach der der Transport von hydrophilen Ionen durch die Zellmembran mit Hilfe von Carriern erfolgen könnte. Sein Konzept gewann jedoch erst durch die Erforschung von Antibiotika mit Komplexbildungseigenschaften an Bedeutung. Zu dieser Stoffgruppe zählen Valinomycin, Enniatine, Gramicidine und Makrotetrolide, die mit einwertigen Kationen Komplexe positiver Ladung bilden, Antibiotika vom Nigericin-Typ, die im Komplex mit Kationen neutral sind, wie auch das Antibiotikum X 537A, das mit zweiwertigen Ionen komplexiert und vorwiegend als Calcium-Carrier fungiert (Läuger, 1972; Pressman, 1973; McLaughlin und Eisenberg, 1975).
Strukturuntersuchungen am Beispiel der Makrotetrolide zeigten, daß diese Verbindungen zahlreiche hydrophile und hydrophobe Gruppen besitzen, die mit einem zu komplexierenden Kation in Wechselwirkung treten.
Die Konfiguration der Komplexe, bei der die lipophilen Gruppen ringförmig nach außen stehen, begünstigt die Permeation durch die Membran und steigert gleichzeitig ihre Selektivität, eine Modellvorstellung, die auch auf andere Ionen-komplexierende Antibiotika übertragbar ist (Wipf et al., 1969).

Zahlreiche Untersuchungen an natürlichen und künstlichen Membranen haben die Funktion dieser Antibiotika für den selektiven Alkalitransport bestätigt. Aufgrund seiner Arbeiten über die Wirkungsweise der Makrolidantibiotika stellte Zähner (1969) eine Hypothese auf, nach der Metallionen-bindende Antibiotika natürliche Carrier

sind, die, verursacht durch eine Deregulation des Stoffwechsels, von der Zelle im Überschuß produziert werden.

Wie die Bedeutung von Carriern für den Alkaliionen-Transport als gesichert angesehen werden kann, wurden auch für den Transport von Eisenionen in den letzten Jahrzehnten wesentliche Erkenntnisse gewonnen. Eisenionen liegen bei physiologischen pH-Werten als schwerlösliche Hydroxyde vor. Eisen wird von den Zellen zudem in höheren Konzentrationen benötigt als die, die üblicherweise für Spurenelemente gelten. Die Fähigkeit, Eisen(III)-ionen komplex zu binden und damit für die Mikroorganismen verfügbar zu machen, haben, neben Verbindungen wie Citrat und Phenolaten, vor allem die natürlich vorkommenden Hydroxamate. Verbindungen dieser Stoffgruppe sind die Siderochrome, die unter Eisenmangel-Bedingungen von den Zellen in größeren Mengen ins Medium abgegeben werden. Zu ihnen zählen eisenhaltige Substanzen mit antibiotischen Eigenschaften, wie das Albomycin, und auch Sideramine, wie die zuerst beschriebenen Verbindungen Ferrichrom, Coprogen, Terregens-Faktor und die Ferrioxamine (Bickel et al., 1960 a,b; Zähner et al., 1962).
Die Wirkungsweise der Sideromycine und der Mechanismus ihrer Antagonisierung durch Sideramine wurden in den Arbeitsgruppen von Zähner und Knüsel bearbeitet (Zähner et al., 1960; Knüsel und Nüesch, 1965; Zimmermann und Knüsel, 1969). Die Untersuchung der Wuchsstoff-eigenschaften, die schon 1953 mit Pilobolus kleinii (Hesseltine et al., 1953) begann, führte schließlich zur Bearbeitung von Transportfunktionen der Sideramine und Spezifität der Komplexbildung bei Neurospora crassa (Winkelmann und Zähner, 1973; Winkelmann, 1974).

Dadurch wurde die Funktion der Sideramine als Eisencarrier bestätigt. In neuester Zeit sind unsere Kenntnisse über die besonderen Bedingungen des Eisentransportes durch die Arbeiten von Hantke und Braun (1976) zur membranabhängigen Eisenaufnahme bei Escherichia coli und die Isolierung verschiedener Rezeptorproteine erweitert worden. Mit der gleichen Problematik beschäftigen sich auch die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Neilands (Leong und Neilands, 1976, Luckey und Neilands, 1976), die Unterschiede in den Transportmechanismen bei der Ablösung des Eisens aus dem Siderophor und in der Konkurrenz zwischen Phagenadsorption und Ferrichromaufnahme bei Escherichia coli und Salmonella typhimurium aufzeigten.
Horowitz et al. (1976) beschrieben den Effekt von Sideraminen auf die Sporulierung und stellten damit diese Stoffklasse in neue Zusammenhänge.

Zu den Eisen-Carriern aus Bakterien zählen die Enterocheline (O'Brien und Gibson, 1970; Pollack und Neilands, 1970), Mycobactine (Snow, 1970; Ratledge et al., 1974), Ferrioxamine (Keller-Schierlein et al., 1964; Müller und Zähner, 1968) und die citronensäurehaltigen Verbindungen Arthrobactin (Lochhead und Burton, 1953; Linke et al., 1972), Aerobactin (Gibson und Magrath, 1969) und Schizokinen (Mullis et al., 1971). Tabelle 1, in der die strukturellen Merkmale dieser Verbindungen wiedergegeben sind, zeigt, daß außer den Enterochelinen, die das Eisen über phenolische Hydroxylgruppen komplexieren, alle Verbindungen die charakteristischen Hydroxamsäuregruppierungen besitzen. Auffällig ist, daß in verschiedenen Substanzen gleiche oder strukturell ähnliche Säurekomponenten und Aminosäurederivate vorkommen. Diese Tatsachen lassen vermuten, daß bei verschiedenen Organismen ähnliche Biosynthesewege und Regulations-

Tabelle 1 : Strukturkomponenten von Eisen-Ionophoren aus Bakterien

Verbindung	Produzent	Anzahl Hydroxamat-Gruppen	Anzahl phenol. OH-Gruppen	Säurekomponente	Aminosäure oder Derivat
Aerobactin	Klebsiella pneumoniae	2	-	Citronensäure	Lysin
Arthrobactin	Arthrobacter pascens	2	-	Citronensäure	Diamino-pentan
Schizokinen	Bacillus megaterium	2	-	Citronensäure	Diamino-propan
Ferrioxamine	Actinomyceten Eubacteriales	3	-	Bernsteinsäure	Diamino-alkane
Mycobactine	Mycobacteria	2	1	Salicylsäure	Lysin
Enterocheline	Escherichia coli Salmonella typhimurium Klebsiella pneumoniae	-	6	Dihydroxy-benzoesäure	Serin

mechanismen für die Bildung der Sideramine vorhanden sein können.
Unter den aus Bakterien isolierten Eisenkomplexbildnern wurde die Biosynthese der Enterocheline, cyclischer Trimere aus 2,3-Dihydroxybenzoyl-L-serin, bei Escherichia coli am eingehendsten untersucht. Mit Mutanten klärten Young et al. (1971) die Syntheseschritte des Bausteins Dihydroxybenzoesäure ausgehend von der Chorisminsäure auf und kartierten auch die für diese Schritte notwendigen Gene. Bryce und Brot (1972) gelang der Nachweis einer ATP-abhängigen Aktivierung von Serin und Dihydroxybenzoesäure und die zellfreie Synthese von 2,3-Dihydroxybenzoylserin. Das über einen Thioester an das Enzym gebundene Serin reagiert mit der aktivierten Dihydroxybenzoesäure, wobei unter Abspaltung des Enzymproteins Dihydroxybenzoylserin entsteht. Ein weiteres Enzym katalysiert die Cyclisierung zur trimeren Verbindung durch Esterbildung. Freies Dihydroxybenzoylserin konnte im Rohextrakt nicht nachgewiesen und bei in vitro Versuchen nicht eingebaut werden (O'Brien et al., 1970; 1971; Bryce et al., 1971; Bryce, 1973; Rosenberg und Young, 1974).

Über die Biosynthese der Mycobactine wurde von Tateson (1970) berichtet. Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen dem ε-N-Hydroxy-N-acetyl-L-lysin im Mycobactin und δ-N-Hydroxy-N-acetyl-L-ornithin in den Ferrichromen ließen Parallelen in den Biosynthesewegen vermuten. Einbauversuche zeigten jedoch im Gegenteil, daß ε-N-Hydroxy-L-lysin von der Zelle nicht aufgenommen und eingebaut wurde. Dieses Ergebnis, wie auch die Tatsache, daß aus dem Rohextrakt N-Hydroxy-L-lysin nicht isoliert werden konnte, schließen jedoch N-Hydroxylysin als Intermediärprodukt der Mycobactinbiosynthese nicht aus. Die Isolierung von ε-N-Acyl-lysin aus Zellen und Langzeiteinbau dieser Verbindung in Mycobactin lassen jedoch keine Aussage über die Reihenfolge der Synthese-

schritte zu, machen jedoch einen Weg wahrscheinlicher, bei dem die Synthese nicht wie bei Ustilago sphaerogena (Emery, 1966) über die Hydroxylierung und anschließende Acetylierung der Aminosäuren verläuft.
Zur Biosynthese der anderen Sideramine aus Bakterien lagen zu Beginn dieser Arbeit keine Untersuchungen vor.

Nach der Strukturaufklärung des Arthrobactins (Linke et al., 1971), eines von Arthrobacter pascens unter Eisenmangel gebildeten Dihydroxamates, schien diese Verbindung aufgrund der beiden Strukturkomponenten Citronensäure und Lysinderivat ein geeignetes Objekt für Biosyntheseuntersuchungen zu sein. Wie Tabelle 1 zeigt, hat Arthrobactin diese Bestandteile mit verschiedenen anderen Sideraminen gemeinsam. Ein Vergleich der Biosynthesewege könnte Analogieschlüsse möglich machen. In Abb. 1 ist die Grundstruktur der drei citronensäurehaltigen Sideramine aus Bakterien aufgezeichnet.

Ein Vergleich der Strukturen zeigt, daß Arthrobactin sich von Aerobactin nur durch das Fehlen der Carboxylgruppe am Lysinderivat unterscheidet. Schizokinen enthält abweichend von den beiden anderen Sideraminen Diaminobuttersäure als Aminkomponente.

Ferrioxamin E, ein cyclisches Tripeptid, enthält wie auch Arthrobactin Diaminopentan als Baustein (Keller-Schierlein und Prelog, 1961). Die Übereinstimmung in der Verknüpfung dieser Aminkomponente mit der organischen Säure, in diesem Falle Bernsteinsäure, ließ auch bei dieser Verbindung ähnliche Biosynthesewege vermuten. Die Struktur von Ferrioxamin E sei in Abb. 2 wiedergegeben.

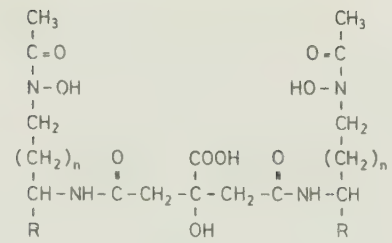


Abb. 1 : Grundstruktur citronensäurehaltiger Sideramine aus Bakterien

Sideramin	Produzent	n	R
Arthrobactin	Arthrobacter pascens	3	H
Aerobactin	Klebsiella pneumoniae	3	COOH
Schizokinen	Bacillus megaterium	1	H

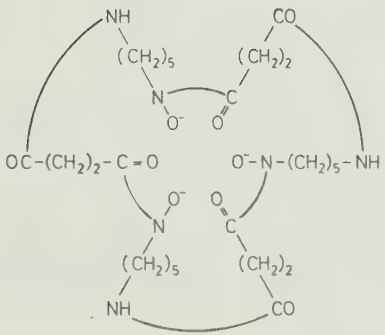


Abb. 2 : Strukturformel von Ferrioxamin E.

Trotz zahlreicher Arbeiten über die Biosynthese einiger Sideramine ist über deren Regulation wenig bekannt. Sicher ist, daß Eisenionen im Medium die Biosynthese der Sideramine aus Pilzen wie aus Bakterien hemmen. Die Regulation des Eisenstoffwechsels durch den Einfluß anderer Metallionen wurde von Padmanaban und Sarma (1966) und Fastrich (1974) untersucht, die bei Neurospora crassa eine Derepression der Desferricoprogenbildung durch Cobalt nachwiesen. Enzymatische Untersuchungen über den Einfluß von Eisenionen wurden nur bei einzelnen an der Synthese der Ionophore beteiligten Enzymen durchgeführt. T. Anke und Diekmann (1972) zeigten, daß die Rhodotorulasäure-Synthetase durch Fe^{3+}-Konzentrationen zwischen 10^{-5}M und 10^{-4}M reprimiert wird, ein Ergebnis, das auch für die Fusigen-Synthetase bestätigt wurde (H. Anke et al., 1973).

Die Biosyntheseuntersuchungen des Enterochelins mit verschiedenen Mutanten gaben Einsicht in die Regulationsmechanismen des Eisentransportes durch Phenolate und Citrat bei Escherichia coli (Cox et al., 1970). In vivo Versuche zeigten, daß an der Synthese beteiligte Enzyme durch Eisen(II)-ionen in Konzentrationen von $5x10^{-6}$M gehemmt wurden (Brot et al., 1966; Brot und Goodwin, 1968).

Bei den von Bacillus subtilis gebildeten Phenolaten stellten Byers und Lankford (1968) ebenfalls eine Hemmung der Bildung von Dihydroxybenzoaten durch Zugabe von $FeSO_4$ (10^{-7} - 10^{-6}M) fest.

Bei Bacillus megaterium wurde ein Anstieg der Schizokinen-Bildung bei Zugabe von Aluminium beobachtet (Davis et al., 1971).

Die Regulation der Biosynthese anderer Sideramine, wie Mycobactine, Ferrioxamine und der citronensäurehaltigen Verbindungen Aerobactin und Arthrobactin, wurde bis jetzt nicht bearbeitet.

Problemstellung

Bei unseren Versuchen zur Biosynthese von Arthrobactin waren wir zunächst davon ausgegangen, daß die ersten Syntheseschritte für die strukturell ähnlichen Verbindungen Arthrobactin und Aerobactin identisch seien. Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden. Dagegen wurde gezeigt, daß Cadaverin in Arthrobactin eingebaut werden kann (Schafft, 1973). Somit war zu vermuten, daß ein wichtiger Schritt in der Arthrobactinbiosynthese die Decarboxylierung des Lysins ist.
In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst die Ergebnisse zum vergleichenden Einbau von Lysin und Cadaverin gesichert und die Stereospezifität der Decarboxylierungsreaktion überprüft werden.
Da auch angenommen werden mußte, daß eine Decarboxylierung der Aminosäurekomponente erst nach ihrer Derivatisierung erfolgen kann, sollte in vivo der Einbau von ε-N-Acetyl-lysin in Arthrobactin bestimmt werden.
Von Interesse war die Reihenfolge der Syntheseschritte bei der Bildung der Hydroxamsäuregruppierung. In der Aufarbeitung zellfreier Extrakte nach Inkubation mit Cadaverin wurde eine Möglichkeit gesehen, weitere Intermediärprodukte nachweisbar zu machen.
Die Herkunft der Citronensäure sollte durch Einbauversuche geklärt werden.
Streptomyces glaucescens bildet Ferrioxamin E, das in Diaminopentan und Bernsteinsäure als Strukturkomponenten gleiche bzw. ähnliche Bausteine enthält wie Arthrobactin. Mit dem Einbau entsprechender Vorstufen in Ferrioxamin E sollte untersucht werden, ob Ergebnisse aus dem Einbau von Verbindungen in Arthrobactin auf Synthesewege in den Ferrioxaminen übertragbar sind.
Die Lysindecarboxylase sollte in vivo und in vitro

untersucht und der mögliche regulatorische Einfluß von Eisen(III)-ionen auf ihre Aktivität geprüft werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Reagenzien

Außer den hier aufgeführten Chemikalien wurden analysenreine Präparate der Firma E. Merck, Darmstadt, verwendet.

Amersham Buchler, Braunschweig

[1,5-^{14}C] - Citronensäuremonohydrat, 20,2 mCi/mMol

Boehringer GmbH, Mannheim

Pyridoxal-5'-phosphat

Acetyl-CoA

Calbiochem AG, Luzern, Schweiz

L-Lysinmonohydrochlorid

Difco Laboratories, Detroit, USA

Hefeextrakt

Malzextrakt

Nutrient Broth

Soytone

Henselwerk, Magstadt

Sojamehl

Hormuth und Vetter, Wiesloch

Whatman 3MM Chromatographiepapier

Macherey-Nagel und Co., Düren

Fertigfolien Polygram Sil N-HR/UV$_{254}$

Merck, Darmstadt

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} (Nr. 5715)

NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain

[1-^{14}C] -Acetanhydrid, 5,0 mCi/mMol

[1,5-^{14}C] -Cadaverindihydrochlorid, 3,27 mCi/mMol

[1,5-^{14}C] -Citronensäure, 8,2 mCi/mMol

[4,5-^{3}H] -DL-Lysin, 24,3 Ci/mMol

[1-^{14}C] -DL-Lysinmonohydrochlorid, 2,04 mCi/mMol

[U-^{14}C] -L-Lysinmonohydrochlorid, 318 mCi/mMol

Nuclear Chicago (Deutschland) GmbH, Frankfurt

Hyaminhydroxyd

Serva Feinbiochemica GmbH und Co., Heidelberg

Adsorberharz XAD-2

Cellogelstreifen

ε-N-Acetyl-L-lysin

Sigma, St. Louis, Mo., USA

Dithiotreitol (DTT)

Strothmann, Minden

Distillers solubles (Getreidetrockenschlempe)

2.2. Laufmittel und Puffer

Laufmittel:

I	Chloroform: Methanol: Wasser (65:25:4)
II	Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) Oberphase
III	Butanol-Ameisensäure-Wasser (4:1:1)
IV	Propanol-Eisessig-Wasser (4:1:1)
V	Isopropanol-Wasser (4:1)
VI	Propanol-Ammoniak 25%ig (7:3)
VII	Chloroform-Methanol-Ammoniak 17%ig (4:4:2)
VIII	Butanol:Äthanol:Wasser (4:1:5), Oberphase

Puffer:

A	Kalium-Phosphat, 0,1 M, pH 7,6 bei 4°C
B	Kalium-Phosphat, 1 M, pH 6,0 bei 4°C
C	Kalium-Phosphat, 0,01 M, pH 7,6 bei 4°C
D	Essigsäure-Pyridin, 0,2 M, pH 5,0 bei Raumtemperatur
E	Tris-HCl, 1 M, pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 bei 4°C
F	Tris-HCl, 0,1 M, pH 7,0 bei 4°C
G	Citrat-Puffer, 0,2 M, pH 5,1 bei Raumtemperatur

2.3. Mikroorganismen

Die untersuchten Mirkoorganismen entstammen den Sammlungen des Instituts für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I der Universität Tübingen (Tü) und des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Technischen Universität Hannover.

Tü 214, ATCC 13346 Arthrobacter pascens Lochhead und Burton

Tü 212, ATCC 25304 Klebsiella pneumoniae (Schroeter), Trevisan (Bergey, 1974)

früher: Aerobacter aerogenes NCW Gibson (Bergey, 1957)

Tü 49, ETH 22794 Streptomyces glaucescens (Preobrazhenskaya) Pridham et al.

2.4. Nährmedien

Minimalmedium für Arthrobacter pascens

KH_2PO_4	13,6	g
$(NH_4)_2SO_4$	2,0	g
L-Asparagin·$1H_2O$	5,0	g
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,0	mg
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2	g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	10,0	mg
Glucose	3,0	g (separat autoklaviert)
entionisiertes Wasser	1	l

Mit KOH wurde pH 7,0 eingestellt

Minimalmedium für Klebsiella pneumoniae

Modifiziertes Medium 56 nach Monod et al. (1951)

KH_2PO_4	13,6	g
$(NH_4)_2SO_4$	2,0	g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2	g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,5	g
Glucose	5,0	g (separat autoklaviert)
entionisiertes Wasser	1	l

Mit KOH wurde pH 7,4 eingestellt

Medium 19 für Streptomyces glaucescens

Sojamehl	20 g
Mannit	20 g
entionisiertes Wasser	1 l

Mit KOH wurde pH 7,5 eingestellt

Medium 14 für Streptomyces glaucescens

Fleischextrakt	3 g
Glucose	10 g
Pepton	5 g
NaCl	5 g
$CaCO_3$	10 g
entionisiertes Wasser	1 l

Mit KOH wurde pH 7,2 eingestellt

Agar für Schrägröhrchen

Nutrient-Broth-Agar		Hefeextrakt-Agar	
Nutrient-Broth	8 g	Hefeextrakt	4 g
Agar	20 g	Malzextrakt	10 g
entionisiertes Wasser	1 l	Glucose	4 g
		Agar	20 g
		entionisiertes Wasser	1 l

Die folgenden drei Medien wurden dem Mikrobiologischen Handbuch der Firma E. Merck, Darmstadt (ohne Jahreszahl) entnommen und teilweise modifiziert.

Koser-Citrat-Medium (Koser, 1923, 1924)

Tri-Na-citrat·$2H_2O$	3,0 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2 g
$(NH_4)_2HPO_4$	1,5 g
KH_2PO_4	1,0 g
entionisiertes Wasser	1 l

Simmons-Citrat-Agar (Simmons, 1926)

$(NH_4)H_2PO_4$	1,0 g
K_2HPO_4	1,0 g
NaCl	5,0 g
tri-Na-citrat·$2H_2O$	2,0 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2 g
Bromthymolblau	0,08 g
Agar	12,0 g
entionisiertes Wasser	1 l

Lysindecarboxylase-Test-Nährboden (Costin, 1968)

Pepton (aus Casein)	6,5 g
Hefeextrakt	3,0 g
Glucose	1,0 g
NaCl	5,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,2 g
L-Lysin·1 HCl	10,0 g
Bromkresolpurpur	32 mg
Agar	20.0 g
entionisiertes Wasser	1 l

Medien zur Optimalisierung der Sideraminbildung bei Streptomyces glaucescens

Medium SS		Medium E	
Sojamehl	28 g	Soytone	10 g
$(NH_4)_2SO_4$	7 g	Mannit	20 g
$CaCO_3$	8 g	K_2HPO_4	2,5 g
Stärke	60 g	NaCl	1,5 g
entionisiertes Wasser	1 l	entionisiertes Wasser	1 l

Mit H_2SO_4 wurde pH 7,0 eingestellt

Medium 38

Malzextrakt	20 g
Distillers Solubles	20 g
NaCl	5 g
$NaNO_3$	1 g
entionisiertes Wasser	1 l

Mit KOH wurde pH 7,5 eingestellt

Es wurden zur Optimalisierung außerdem die oben beschriebenen Medien 14 und 19 verwendet.

2.5. Kulturbedingungen

Stammkulturen
Zur Stammerhaltung wurde Streptomyces glaucescens auf Schrägröhrchen mit Hefeextrakt-Agar, die Stämme Arthrobacter pascens und Klebsiella pneumoniae auf Nutrient-Broth-Agar angezogen und bei 4°C oder als Lyophilisat aufbewahrt.

Sideraminproduktion
Herstellung von Arthrobactin durch A. pascens:
150 ml Minimalmedium in 500ml-Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich werden mit 1% einer 20 Std alten Vorkultur beimpft und bei 27°C auf der Schüttelmaschine (Infors RC 106) bei 120 UpM inkubiert.

Herstellung von Aerobactin durch K. pneumoniae:
100 ml Minimalmedium in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich werden mit 1% einer 12 Std alten Vorkultur beimpft und bei 37°C und 180 UpM auf der Inkubationsschüttelmaschine (Infors RC 1 TK) inkubiert.

Herstellung von Ferrioxaminen durch S. glaucescens:
150 ml Medium 14 in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich werden mit 2% einer 24 Std alten Vorkultur auf Medium 19 beimpft und bei 27°C auf der Schüttelmaschine (Infors RC 106) bei 120 UpM inkubiert.

Der Verlauf der Fermentationskurven von A. pascens und K. pneumoniae wurde in der Diplomarbeit beschrieben (Schafft, 1973).

2.6. Nachweis der Sideramine

Testmethode I

2,5 ml Kultur werden mit 0,5 ml einer $FeCl_3$-Lösung (5mg/ml) versetzt. Der Leerwert besteht aus 2,5 ml Kulturbrühe und 0,5 ml H_2O. Die Proben werden zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes nach 30 Min bei 405 nm (Arthrobactin) und 436 nm (Aerobactin) im Eppendorf Photometer bestimmt. Mit dem Umrechnungsfaktor $E^{1\%}_{1cm} = 33,4$ wurde die Sideraminkonzentration berechnet.

Testmethode II

2,5 ml Kulturfiltrat werden mit 0,5 ml einer $FeCl_3$-Lösung (5mg/ml) versetzt. Nach 30 Min wird die wässrige Phase mit 2,5 ml eines Chloroform/Phenol-Gemisches (1:1 Volumen/Gewicht) ausgeschüttelt und 10 Min zentrifugiert. Die Extinktion der organischen Phase wird zur Bestimmung des Ferrioxamingehaltes bei 436 nm gegen Chloroform/Phenol gemessen. Zur Berechnung der Konzentration diente der Wert $E^{1\%}_{1cm} = 35,0$.

2.7. Isolierung der Sideramine

Extraktion mit Chloroform/Phenol

Das Kulturfiltrat wurde mit $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ in geringem Überschuß versetzt und nach 30 Min mit Chloroform/Phenol (1:1 Volumen/Gewicht) wiederholt ausgeschüttelt, bis sich die organische Phase nicht mehr durch Sideramine färbte. Die Chloroform/Phenol-Extrakte wurden vereinigt und dreimal mit 2-4 ml Wasser zur Entfernung von Salzen ausgeschüttelt. Durch Extraktion der organischen Phase mit der zweifachen Menge Diäthyläther und möglichst wenig Wasser wurden die Sideramine wieder in die wässrige Phase

überführt. Diese Lösung wurde mehrfach mit Diäthyläther gewaschen, um das Phenol zu entfernen. Der Äther wurde am Rotationsverdampfer abgezogen, das Sideramin anschließend lyophilisiert.

Extraktion über Amberlite XAD-2
Mit 35 g gewaschenem, evakuiertem Adsorberharz Amberlite XAD-2 wurde eine Säule (12 cm Höhe, 2,5 cm ø) gefüllt. 150 ml des eisenhaltigen Kulturfiltrates wurden aufgetragen. Mit Wasser wurde nachgewaschen, bis das Eluat farblos war. Darauf konnte das Sideramin mit einem Gemisch aus Aceton/Wasser (1:1) eluiert, das Eluat eingeengt und lyophilisiert werden. Die Tropfgeschwindigkeit der Säule soll nicht mehr als 4 Bettvolumen/Std betragen.

2.8. Reinigung der Sideramine

Elektrophorese
Die radioaktiv markierten Sideramine wurden durch Elektrophorese (Serva-Multiphorese-Kammer und -Gleichrichter) auf Cellogelstreifen (25 x 170 mm) gereinigt. Die Spannung betrug 200 V während einer Laufzeit von 20 Min in 0,2 M Essigsäure-Pyridin-Puffer pH 5,0. Die rötlich gefärbte Siderambande wurde ausgeschnitten und mit einem Gemisch aus Methanol/Wasser (1:1) eluiert.

Dünnschichtchromatographie
Die Sideramine konnten durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten (Merck) in den Laufmitteln I, II, VI gereinigt werden.

2.9. Messung der Radioaktivität

Radioaktive wässrige Proben von nicht mehr als 0,01 ml wurden in 0,5 ml Hyaminhydroxyd gelöst. Nach Zugabe von 5 ml Scintillationsflüssigkeit (4 g PPO und 50 mg POPOP in 1 l Toluol gelöst) wurden die Proben im Flüssig-Scintillationszähler (Mark II und Isocap 300, Nuclear Chicago) gemessen. Eine Quenchkorrektur wurde nach der Methode der externen Standardisierung vorgenommen.
Dünnschichtchromatogramme konnten mit dem Radiogramm-Scanner (Bertholt Friesecke) ausgewertet werden.

2.10. Nachweis und Bestimmung der Aminosäuren

Zum Nachweis von Aminosäure-Gruppen auf Chromatogrammen wurde eine 0,2%ige Ninhydrinlösung in n-Butanol aufgesprüht und das Chromatogramm 5 Min bei 110°C getrocknet.

Zur quantitativen Bestimmung (Clark, 1964) wurde nach folgender Vorschrift verfahren:

Ninhydrin-Reagens: 40 mg $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ gelöst in 25 ml Puffer G werden zu einer Lösung von 1 g Ninhydrin gelöst in 25 ml Äthylenglykol-Monomethyläther gegeben.

1,5 ml des Ninhydrin-Reagens wurden mit 0,5 ml der Testlösung (etwa $5 \cdot 10^{-4}$M) versetzt und 20 Min im siedenen Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 8 ml n-Propanol (50%ig) zugegeben. 10 Min später konnte bei 578 nm die Extinktion bestimmt und mit Hilfe einer Eichkurve die Konzentration ermittelt werden.

2.11. Herstellung radioaktiver Vorstufen

[Acetyl-^{14}C] ε-N-Acetyl-L-lysin (analog nach Anke, 1973)
Eine tiefgekühlte Ampulle mit 100 µCi [1-^{14}C] -Acetanhydrid wurde sofort nach dem Öffnen mit 40 mg L-Lysin, gelöst in 0,8 ml Wasser, versetzt und 10 Min im Wasserbad bei 50°C erwärmt. Darauf wurde in 2 Portionen 0,048 ml unmarkiertes Acetanhydrid zugegeben und 20 Min bei 50°C (Wasserbad) inkubiert. Mit 10 ml Methanol wurde die Reaktion abgebrochen, die Lösung in einen Rundkolben überführt und am Rotationsverdampfer eingeengt.
Nach Auftrennung des Reaktionsgemisches in Laufmittel VIII auf Whatman 3MM - Chromatographiepapier wurde die ε-N-Acetyl-lysin-Bande durch Vergleich mit einer authentischen Substanz (Serva) nach Anfärben mit Ninhydrin identifiziert. Die Bande wurde ausgeschnitten, mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1) eluiert und eingeengt. Es schloß sich eine weitere Dünnschichtchromatographie im Laufmittel VII an, deren Radiogramm keine Verunreinigungen mehr zeigte.
Es wurden bei dieser Darstellung 12,3 µCi [Acetyl-^{14}C] ε-N-Acetyl-L-lysin isoliert. Die spezifische Aktivität wurde nach quantitativer Aminosäurebestimmung und Radioaktivitätsmessung im Flüssig-Scintillationszähler zu 0,07 µCi/µMol errechnet.

ε-N-Acetyl-[1-^{14}C]-DL-lysin

[1-^{14}C] -DL-Lysin ($2{,}52 \cdot 10^6$ dpm) in 0,1 ml Wasser wurden mit 10 mg L-Lysin in 0,3 ml Wasser zu einer spezifischen Aktivität von 0,0206 µCi/µMol verdünnt. Die Lösung wurde 10 Min auf 50°C im Wasserbad erwärmt und mit 0,3 ml Acetanhydrid versetzt. Nach 20 Min bei 50°C (Wasserbad) bricht man die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Methanol ab. Die Reaktionsprodukte wurden nach dem Eindampfen chromatographisch auf Kieselgel 60 F_{254} im Laufmittel IV

aufgetrennt. Ein Streifen des Chromatogramms wurde mit Ninhydrin besprüht. Die ε-N-Acetyl-lysin-Bande konnte durch Vergleich mit authentischer Substanz (Serva) lokalisiert werden. Das Präparat wurde nach Auskratzen der Bande mit 5 ml Wasser 60 Min im Wasserbad bei 60°C (Kobayashi und Harris) eluiert, zentrifugiert und der Überstand eingeengt. Nach einer weiteren Chromatographie auf Whatman 3MM im Laufmittel VI war die Substanz frei von Verunreinigungen. Die eingesetzte Vorstufe ließ sich in beiden Laufmitteln wegen ihres niedrigen Rf-Wertes gut abtrennen.

Die Ausbeute an ε-N-Acetyl-[1-^{14}C] -DL-lysin betrug 18% der eingesetzten Radioaktivität.

Acetylierung von [1,5-^{14}C] -Cadaverin

20 mg Cadaverin wurden in 0,2 ml H_2O gelöst und nach Zugabe von 0,1 ml [1,5-^{14}C] -Cadaverin (0,1 µCi/ml) 10 Min bei 50°C im Wasserbad erwärmt. Während der anschließenden Acetylierung mit 0,3 ml Acetanhydrid blieb die Probe weitere 20 Min im Wasserbad bei 50°C. Die Reaktion wurde mit 10 ml Methanol abgebrochen. Nach dem Einengen wurde das Präparat chromatographisch aufgetrennt.
Dazu eignen sich folgende Laufmittel: I - III, VI.

2.12. Einbau radioaktiver Vorstufen in Vivo

Die Anzucht der Zellen erfolgte wie bei den unter 2.5. beschriebenen Produktionsbedingungen. Zum Zeitpunkt der Zugabe der radioaktiven Verbindungen wurde durch Extinktionsmessung die Sideraminkonzentration bestimmt. Nach der im einzelnen angegebenen Inkubationsdauer wurde die Sideraminbildung durch Zugabe von Eisen(III)-ionen gehemmt, das Sideramin durch Ausschütteln mit

Chloroform/Phenol isoliert und elektrophoretisch gereinigt. Die Sideraminbande wurde aus dem Cellogelstreifen geschnitten, wie beschrieben eluiert und die Konzentration des Eluats bestimmt. Über die Messung der Radioaktivität eines Aliquots konnten die spezifische Aktivität des Produktes und der prozentuale Einbau der Vorstufe in Sideramin errechnet werden.

2.13. Hydrolyse von Desferri-[^{14}C]-arthrobactin

Herstellung von [^{14}C]-markiertem Arthrobactin

Einer unter Standardbedingungen 15 Std gewachsenen Kultur von A. pascens wurde bei einer Trübung von E_{578} = 7,9 und einer Extinktion von 0,315 bei 405 nm im Sideramintest I 1 µCi [1,5-^{14}C]-Cadaverin zugesetzt. Nach dreistündiger Inkubation auf der Schüttelmaschine bei 27°C und 120 UpM wurde die Kultur, der eine dem Sideramingehalt entsprechende $FeCl_3$-Konzentration zugegeben worden war, eingefroren. Der Sideramingehalt betrug zum Zeitpunkt des Versuchsabbruchs 0,38 mg/ml.
Das eisenhaltige Kulturfiltrat wurde über einer Amberlite XAD-2 Säule extrahiert. Nach dem Lyophilisieren konnten 14,5 mg [^{14}C]-Arthrobactin dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel 60 F_{254} gereinigt werden. Im Laufmittel I bleibt die Vorstufe am Start zurück, während Arthrobactin einen Rf-Wert von 0,15 zeigt. Die rötliche Bande wurde mit 5 ml Wasser eluiert (60 Min im Wasserbad bei 60°C).
Nach einer zweiten Dünnschichtchromatographie im Laufmittel V war im Radiogramm keine Verunreinigung des Arthrobactins sichtbar.

Herstellung von eisenfreiem [^{14}C]-Arthrobactin

(Zähner et al., 1963)

Präparate von Arthrobactin (10 mg) und [^{14}C]-Arthrobactin (8 mg), die beide dünnschichtchromatographisch rein waren, wurden in 1,2 ml Wasser gelöst. Unter Rühren wurden dem Arthrobactin im Eisbad 48 mg 8-Hydroxychinolin, gelöst in 0,9 ml Methanol, zugesetzt. Der Niederschlag wurde nach 20 Min abzentrifugiert und mehrfach mit wenig Wasser gewaschen. Um das 8-Hydroxychinolin zu entfernen, wurden die vereinigten wässrigen Fraktionen mit Chloroform, Chloroform/Äther (1:2) und Äther ausgeschüttelt. Nach dem Einengen wurde das Präparat lyophilisiert.
Spezifische Aktivität: 0,0062 µCi/µMol
Ausbeute: 5,3 mg

Saure Hydrolyse (Mullis et al., 1971)

Die Hydrolyse des lyophilisierten Desferri-[^{14}C]-arthrobactins (5,3 mg) wurde in 2 ml 6N HCl 18 Std bei 105°C im Bombenrohr durchgeführt. Anschließend wurde das Hydrolysat im Vakuum über NaOH eingeengt.

2.14. Identifizierung der Hydrolyseprodukte des Arthrobactins

Test mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)

0,1 ml des Hydrolysates und 0,2 ml Tetramethylharnstoff wurden mit 0,1 ml einer Mischung aus 2 % TTC (in Wasser) und 1 N NaOH (1:1) versetzt. Sind reduzierende Gruppen vorhanden, so wird im Reaktionsgemisch eine deutliche Rotfärbung sichtbar.

Dünnschichtelektrophorese

Die Dünnschichtelektrophorese wurde auf Kieselgel 60 F_{254} in Pyridin/Eisessig/Wasser (1:10:90) bei pH 3,3 durchgeführt (Desaga DE-Doppelkammer). Die angelegte Spannung betrug 500 V bei einer Elektrophoresezeit von 30 Min.

2.15. Proteinbestimmung (Warburg und Christian, 1941 /1942)

Die Extinktionen der Proteinlösungen wurden bei 260 nm und 280 nm im Zeiss Photometer PM 6 gegen Puffer als Leerwert gemessen. Mit einem Nomogramm von E. Adams (California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles) ließ sich der Gehalt an Protein und Nukleinsäuren bestimmen.

2.16. Ultraschallaufschluß

Für den Zellaufschluß wurden 20 Std alte Kulturen (3 x 150 ml) zweimal mit Puffer A gewaschen. Nach 10 Min Zentrifugation bei 14.000 UpM (Beckman J21) wurden 3 g Zellmasse-Feuchtgewicht in 30 ml Puffer A aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde mit dem Branson Sonifier B-12 (12''-Spitze) 5 x 1 Min mit Kühlintervallen von je 1 Min auf Stufe 5 (80 Watt) beschallt, die Zellpartikel anschließend 30 Min bei 20.000 UpM abzentrifugiert. Die Behandlung der Zellen erfolgte unter Kühlung im Eisbad.
Proteinbestimmungen nach unterschiedlicher Dauer der Beschallung zeigten, daß nach der angegebenen Vorschrift 80% des Proteingehaltes im zellfreien Extrakt nachweisbar war.

2.17. Transport markierter Citronensäure

Die Durchführung des Versuchs erfolgte in Abwandlung der Vorschrift von Horecker et al. (1960).
10 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden zweimal mit Puffer F gewaschen und auf eine Trübung von E_{578} = 1,35 eingestellt. 0,05 ml (1 µCi) [1,5-^{14}C] - Citronensäure wurden in kleinen Kolben vorgegeben und nach Zufügen von 2,5 ml der Zellsuspension auf der Schüttelmaschine (New Brunswick G 76) im Wasserbad bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten, für die jeweils ein Kölbchen vorbereitet war, wurde das Medium über Membranfilter (Selectron, Schleicher und Schüll , 25 mm ø, Porengröße 0,45 nm) schnell abgesaugt und die Zellen mit 200 ml eiskaltem, entionisiertem Wasser gewaschen. Nachdem die Filter getrocknet waren, wurde ihre Radioaktivität in 5 ml Toluol-Scintillationsflüssigkeit gezählt.

2.18. Nachweis der Lysindecarboxylase-Aktivität

Qualitativer Nachweis im Agarplattentest

Eine zur Differenzierung von Salmonella- und Edwardsiella-Kulturen von Costin (1968) entwickelte Methode wurde dahingehend abgewandelt, daß nur die Lysindecarboxylase-Aktivität des Stammes untersucht wurde.
Der auf pH 5,6 eingestellte Spezialnährboden zeigte in dünner Schicht eine gelbe Farbe. Lysindecarboxylase-positive Organismen bewirken durch Bildung von Cadaverin eine Verschiebung des pH-Wertes gegen den Neutralpunkt und führen zu einem Umschlag des Indikators von gelb nach violett. Die Stämme wurden durch Ausstreichen auf Nährboden in Petrischalen untersucht.

Quantitativer Nachweis mit radioaktiv markiertem Substrat

Diese Testmethode beruht auf einer Abspaltung von radioaktiv markiertem CO_2 aus [1-^{14}C]-DL-Lysin. Die Reaktion läuft in gut verschlossenen Warburg-Kölbchen ab. Das Hauptgefäß enthielt bei in vivo Versuchen 2 ml Kultur, bei Untersuchung des zellfreien Extraktes 1,75 ml Proteinlösung, 0,1 ml 10^{-5}M Pyridoxal-5'-phosphat, 0,1 ml 0,2M $MgCl_2$. Nach Zugabe von 0,05 ml [1-^{14}C] -DL-Lysin (etwa 70.000 dpm pro Ansatz) wurde das Gefäß verschlossen. Die Zellen wurden unter leichtem Schütteln bei Zimmertemperatur auf der Schüttelmaschine (New Brunswick G 76), die Proteinlösung bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Um die Reaktion abzubrechen, kann aus dem Seitenarm 0,2 ml 3M Trichloressigsäure einfließen. Während die Testlösung eine weitere Stunde geschüttelt wurde, absorbierte das stark basische Hyamin (0,4 ml) im Mittelgefäß das gebildete CO_2. 0,2 ml Hyamin wurden zur Bestimmung der Radioaktivität im Flüssig-Scintillationszähler verwendet. Die Menge des abgespalteten CO_2 entspricht der Menge an umgesetztem Substrat. Die Enzymaktivität wird definiert als: nMol Lysin/mg Protein unter Testbedingungen.

2.19. Bestimmung von Eisen(III)-ionen (Fries und Getrost, 1975)

20 ml der zu untersuchenden Lösung wurden mit 2 ml Ascorbinsäurelösung (10%), 5 ml Acetatpuffer (16,5 g Natriumacetat und 11,5 ml Essigsäure mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt) und 1 ml Bathophenanthrolindisulfonsäure Dinatriumsalz-Reagens (1 mg/ml Wasser) versetzt. Die Lösung wurde mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und nach 15 Min die Extinktion bei 535 nm in Küvetten von 5 cm Schichtdicke gegen einen Leerwert mit Wasser bestimmt. Aus einer Eichkurve läßt sich der Gehalt an Eisen(III)-ionen ablesen.

2.20. Trockengewichtsbestimmung

Filterpapiere wurden 2 Std im Trockenschrank bei 100°C getrocknet, weitere 1,5 Std bei Raumtemperatur belassen und anschließend gewogen. Die zu wägende Zellmasse wurde über das Filter abgesaugt, dreimal gewaschen und nach dem gleichen Verfahren wie ohne Zellen getrocknet, abgekühlt und gewogen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Versuche mit Lysin und dessen Derivaten

3.1.1. In vivo Einbau mit Arthrobacter pascens

Einbauversuche mit möglichen Vorstufen sind dann besonders aussagekräftig, wenn bei ihnen der Einfluß unterschiedlicher Kulturbedingungen ausgeschlossen werden kann. Dazu eignet sich die Inkubation von Verbindungen, die mit verschiedenen Radioisotopen markiert sind, in einem Versuchsansatz. Ein Vergleich des Einbaus läßt den Schluß zu, daß die mit einem höheren Prozentsatz bei niedrigerem Verdünnungsfaktor eingebaute Substanz die in der Biosynthese dem Produkt näherliegende Vorstufe ist (Bu'Lock, 1965).

Die in Mikroorganismen nachgewiesenen Aminosäuredecarboxylasen sind mit Ausnahme der Diaminopimelinsäuredecarboxylase nur bei L-Aminosäuren aktiv (Meister, 1965). Da für unsere Einbauversuche mit Lysin ein racemisches Gemisch verwendet werden sollte, mußte zunächst die Stereospezifität des decarboxylierenden Enzyms bei A. pascens überprüft werden. Dazu wurden in einem Ansatz in vivo L- und DL-Lysin mit unterschiedlicher radioaktiver Markierung inkubiert. Aus dem prozentualen Einbau und der spezifischen Aktivität des Produktes ist die Verwertbarkeit der Strukturisomeren abzulesen. Die Bedeutung einer Decarboxylierung läßt sich zum einen bei Vergleich des Einbaus von Lysin und Cadaverin nachweisen, indem Cadaverin als primäre Vorstufe in das Stoffwechselprodukt besser und mit kleinerem Verdünnungsfaktor eingebaut wird als Lysin. Eine andere Möglichkeit bietet sich durch Inkubation von C-1-markiertem Lysin. Das anschließend isolierte Arthrobactin sollte

keine Radioaktivität mehr aufweisen.
Eine Decarboxylierung als Schritt in der Biosynthese des Arthrobactins schließt nicht aus, daß der Organismus auch die Fähigkeit besitzt, zunächst Derivate des Lysins herzustellen, um sie anschließend zu decarboxylieren und mit der Citronensäure zu verknüpfen. Mit einem Einbau von ε-N-Acetyl-L-lysin in wachsende Zellen von A. pascens sollte die Wahrscheinlichkeit dieses Syntheseweges überprüft werden.

Wie in Material und Methoden beschrieben, erfolgte bei den in vivo Einbauversuchen die Zugabe der radioaktiven Verbindungen zu je 150 ml in Minimalmedium wachsenden Zellen zu Beginn der Sideraminbildung. Zugabezeitpunkt und Zeitpunkt des Abbruchs der Inkubation wurden zur Berechnung des Einbaus und zur Charakterisierung des Zustandes der Kultur spektralphotometrisch durch Bestimmung des Sideramingehaltes definiert. Das Sideramin wurde sofort oder nach Einfrieren des eisenhaltigen Kulturfiltrates mit Chloroform/Phenol extrahiert. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des isolierten Produktes wurde die elektrophoretisch gereinigte Substanz verwendet.

Einbau von [U-^{14}C] -L-Lysin und [4,5-^{3}H] -DL-Lysin

Einer Kultur mit der Extinktion von 0,175 bei 405 nm wurden die Verbindungen [U-^{14}C] -L-Lysin (spezifische Aktivität: 3,18 mCi/mMol) und [4,5-^{3}H] -DL-Lysin (spezifische Aktivität: 3,27 mCi/mMol) in Konzentrationen von 1,17 und 1,02 µCi/150 ml Medium zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Std wurde die Konzentration des elektrophoretisch gereinigten Arthrobactins bestimmt und ein Aliquot im Scintillationszähler gezählt.

Einbau von [U-^{14}C] -L-Lysin in Arthrobactin: 24%
Verdünnungsfaktor: 711

Einbau von [4,5-^{3}H] -DL-Lysin in Arthrobactin: 11%
Verdünnungsfaktor: 1350

Die in Tabelle 2 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß bei einem unter identischen Bedingungen vorgenommenen Vergleich des Einbaus der optisch aktiven L-Form des Lysins und seines Racemates von [U-^{14}C] -L-Lysin die doppelte Menge bei einem halb so großen Verdünnungsfaktor eingebaut wurde.
Dieses Ergebnis wurde bei den weiteren Versuchen insoweit berücksichtigt, als beim Vergleich Cadaverin/Lysin vom letzteren die doppelte Menge Radioaktivität (bei gleicher spezifischer Aktivität) eingesetzt wurde.

Nachweis von Radioaktivität in Arthrobactin nach in vivo Inkubation mit markiertem Lysin und Cadaverin

1,25 µCi [1,5-^{14}C] -Cadaverin und 2.35 µCi [4,5-^{3}H] -DL-Lysin gleicher spezifischer Aktivität von 3,27 mCi/mMol wurden der wachsenden Kultur (E_{405} = 0,09) zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 7,25 Std wurde die Menge des gebildeten Sideramins bestimmt und Arthrobactin isoliert. Das Präparat wurde durch Elektrophorese bei pH 5,0 gereinigt, der Sideramingehalt über die Extinktion berechnet und ein Aliquot gezählt.

Einbau von [1,5-^{14}C] -Cadaverin in Arthrobactin: 82%
Verdünnungsfaktor: 171

Einbau von [4,5-^{3}H] -DL-Lysin in Arthrobactin: 16%
Verdünnungsfaktor: 465

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt und machen den bei wesentlich niedrigerem Verdünnungsfaktor besseren Einbau von Cadaverin deutlich.

Tabelle 2 : Einbau radioaktiver markierter Vorstufen in wachsende Zellen von A. pascens

Vorstufe*	Menge	E_{405} bei Zugabe	Inkubationszeit	spezifische Aktivität d. Arthrobactins	Verdünnungsfaktor	Einbau**
	µCi		Std	µCi/mMol		%
[^{14}C] -L-Lysin	1,02	0,175	5	4,46	711	24
[^{3}H] -DL-Lysin	1,17			2,41	1350	11
[^{14}C] -Cadaverin	1,25	0,09	7,25	19,1	171	82
[^{3}H] -DL-Lysin	2,35			7,04	465	16

* [1,5-^{14}C] -Cadaverin (spezifische Aktivität: 3,27 mCi/mMol)
[4,5-^{3}H] -DL-Lysin (spezifische Aktivität: 3,27 mCi/mMol)
[U-^{14}C] -L-Lysin (spezifische Aktivität: 3,18 mCi/mMol)

** bezogen auf die Menge Arthrobactin bei Abbruch der Inkubation

Unter den gleichen Bedingungen wurden Kulturen (E_{405} = 0,145) mit [1-^{14}C] -DL-Lysin (spezifische Aktivität: 2,04 mCi/mMol, 1,28 µCi/150 ml Medium) 5,5 Std inkubiert. Nach Isolierung des Arthrobactins war darin [^{14}C] -Aktivität nur zu 0,2% bei einem Verdünnungsfaktor von 31.820 nachweisbar. Diese Kontrolle zeigt, daß die Radioaktivität von [1-^{14}C] -DL-Lysin durch Decarboxylierung entfernt wird. Ein sehr geringer Teil des CO_2 wird durch Carboxylierungsreaktionen im Stoffwechsel wieder eingebaut. Ein zum Vergleich angebotenes [4,5-^{3}H] -DL-Lysin bestätigte die Syntheseaktivität während der Inkubationszeit.

Einbau von [Acetyl-^{14}C] ε-N-Acetyl-L-lysin und [4,5-^{3}H]-DL-Lysin

Es wurde nach dem im methodischen Teil beschriebenen Verfahren [Acetyl-^{14}C] ε-N-Acetyl-L-lysin hergestellt und chromatographisch gereinigt. 1 µCi dieses Präparates wurde zusammen mit 2,76 µCi [4,5-^{3}H]-DL-Lysin (spezifische Aktivität: 0,07 mCi/mMol) bei einer Extinktion von 0,145 bei 405 nm zu den wachsenden Zellen gegeben. Nach 5 Std Inkubation wurde das Arthrobactin isoliert, gereinigt und seine Radioaktivität bestimmt.

Einbau von [Acetyl-^{14}C] ε-N-Acetyl-L-lysin in Arthrobactin : 5%

Einbau von [4,5-^{3}H]-DL-Lysin in Arthrobactin: 11%

Der Einbau des acetylierten Lysins war geringer als der von Lysin (Tabelle 3). Es wurde davon ausgegangen, daß die spezifische Aktivität der eingesetzten Vorstufen annähernd gleich, aber nicht genau bestimmbar war. Daher wurde auf eine Berechnung der Verdünnungsfaktoren verzichtet.

Tabelle 3 : Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in wachsende Zellen von A. pascens

Vorstufe *	Menge	E_{405} bei Zugabe	Inkubationszeit	spezifische Aktivität d. Arthrobactins	Einbau **
	µCi		Std	µCi/mMol	%
ε-N-[^{14}C-Acetyl]-L-lysin	1	0,145	5	1,2	5
[^{3}H]-DL-Lysin	2,76			8,2	11

* [Acetyl-^{14}C] ε-N-Acetyl-L-lysin

[4,5-^{3}H] -DL-Lysin

Die spezifische Aktivität beider Verbindungen betrug etwa 0,07 mCi/mMol

** bezogen auf die Menge Arthrobactin bei Abbruch der Inkubation

3.1.2. Nachweis von Intermediärprodukten der Arthrobactin-Biosynthese

Die Decarboxylierung von Lysin oder eines seiner Derivate als erster Schritt in der Biosynthese des Arthrobactins konnte nach den in vivo Einbauversuchen als gesichert angenommen werden. Da mögliche Intermediärprodukte des Biosyntheseweges wie N-Acetylcadaverin, N-Hydroxy- oder N-Acetyl-N-hydroxy-cadaverin als radioaktiv markierte Präparate nicht käuflich sind, wurden weitere in vivo Einbauversuche mit diesen Vorstufen nicht durchgeführt.
Es sollte daher der Versuch unternommen werden, nach kurzzeitiger in vitro Inkubation mit markiertem Cadaverin nach Intermediärprodukten zu suchen. Zur späteren Identifizierung wurden Monoacetylcadaverin durch Umsatz von Cadaverin mit Essigsäureanhydrid und N-Hydroxycadaverin in Analogie zur Methode von Gibson und Magrath (1969) durch Hydrolyse von eisenfreiem Arthrobactin hergestellt.

N-Acetyl-[1,5-^{14}C]-cadaverin

Durch Acetylierung von [1,5-^{14}C]-Cadaverin mit Acetanhydrid nach der in Material und Methoden angegebenen Vorschrift entstehen das Mono- und das Diacetylierungsprodukt. Die Auftrennung erfolgte dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel in den Laufmitteln I - III und VI. Die Produkte wurden durch ein Radiogramm lokalisiert und konnten nach Besprühen der Chromatogramme mit Ninhydrin identifiziert werden. In Tabelle 4 sind die unter verschiedenen Chromatographiebedingungen gefundenen Rf-Werte des Cadaverins und seiner Acetylierungsprodukte zusammengefaßt.

Tabelle 4 : Rf-Werte von Cadaverin und Acetylierungsprodukten

DC-Platten	Polygram Sil N-HR/UV$_{254}$		Kieselgel 60 F$_{254}$			Laufstrecke nach DE*
Laufmittel	I	II	I	III	VI	[cm]
Cadaverin	0,05	0,05	0,04	0,16	0,17	- 6,8
Monoacetyl-cadaverin	0,18	0,24	0,18	0,37	0,51	- 3,0
Diacetal-cadaverin	0,63	0,45	0,53	0,50	0,77	- 0,6

* - : in Richtung Kathode

Als weiteres Trennverfahren für diese Präparate wurde die Dünnschichtelektrophorese bei pH 3,3, wie in Material und Methoden beschrieben, herangezogen. Die nach Identifikation mit Ninhydrin auf dem Radiogramm ermittelten Laufstrecken sind ebenfalls in Tabelle 4 aufgeführt.

N-Hydroxycadaverin

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde durch Inkubation der wachsenden Zellen mit [1,5-^{14}C] -Cadaverin markiertes Arthrobactin hergestellt und chromatographisch gereinigt. 8 mg dieses Präparates wurden mit 10 mg unmarkiertem Arthrobactin versetzt und nach Vorschrift mit 8-Hydroxychinolin eisenfrei gemacht. Ein Teil dieses Desferri-[^{14}C] -arthrobactins wurde in HCl hydrolysiert. Nach Einengen des Hydrolysates über NaOH konnte das Gemisch dünnschichtchromatographisch und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Rf-Werte der Banden nach Radiogramm und das Verhalten im Ninhydrin-Test sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5 : Rf-Werte nach Hydrolyse von eisenfreiem Arthrobactin
(Ninhydrin-positive Flecken sind mit +, das Hauptprodukt ist mit o bezeichnet)

DC-Platten	Polygram Sil N-HR/UV$_{254}$	Kieselgel 60 F$_{254}$		
Laufmittel	II	I	III	VI
	0,05+	0,04+	0.12+	0,12
	0,23+o	0,17+o	0,27+	0,22+
	0,36	0,33	0,34+o	0,32
	0,51		0,51	0,45+
			0,77	0,52+o

Der Nachweis reduzierender Gruppen im Hydrolysegemisch mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid fiel positiv aus. Hauptprodukt war jeweils das Ninhydrin-positive Produkt mit dem höchsten Rf-Wert.
1-Amino-3-(N-hydroxyamino)propan, Hauptprodukt der Hydrolyse des eisenfreien Schizokinens hat nach Papierchromatographie in Butanol/Wasser/Essigsäure (60:25:15) einen Rf-Wert von 0,23 (Mullis et al., 1971). Demnach darf angenommen werden, daß es sich bei dem Hauptprodukt der Hydrolyse des Arthrobactins um N-Hydroxycadaverin handelt.

Die Rf-Werte des Arthrobactins in verschiedenen Laufmittelsystemen wie auch sein Laufverhalten bei Dünnschichtelektrophorese seien hier aufgeführt:

Tabelle 6 : Rf-Werte von Arthrobactin

DC-Platten	Polygram SilN-HR/UV_{254}			Kieselgel 60 F_{254}				Laufstrecke nach DE * [cm]
Laufmittel	I	II	V	I	III	V	VI	
	0,22	0,09	0,37	0,15	0,15-0,28	0,26	0,32	+ 0,2

* + : in Richtung Anode

Inkubation von zellfreien Extrakten von Arthrobacter pascens mit [1,5-^{14}C] -Cadaverin

Nach der in Material und Methoden angegebenen Vorschrift wurden Zellen von A. pascens mit Ultraschall aufgeschlossen. Die verwendeten Kulturen befanden sich in einen Stadium aktiver Sideraminbildung. Ein Teil des zellfreien Extraktes wurde mit markiertem Cadaverin inkubiert. In ersten Versuchen, bei denen den Proteinlösungen außer Magnesiumionen noch DTT (1mM) als SH-Schutzgruppenreagens zugefügt wurde, zeigte sich, daß in einem Leerwert, der [1,5-^{14}C] -Cadaverin, $MgCl_2$ und Puffer A mit DTT enthielt, nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung (Polygram Sil N-HR/UV_{254}, Laufmittel II) neben der eingesetzten Vorstufe (Rf-Wert: 0,07) Radioaktivität in einer Substanz mit Rf-Werten

zwischen 0,16 und 0,19 nachweisbar war. Das entstandene Produkt ließ sich nur durch eine Reaktion der Vorstufe mit DTT erklären. Von Zugabe des DTT wurde aus diesem Grunde in den folgenden Versuchen abgesehen. Auch Acetyl-CoA, das als möglicher Cofaktor von Acetylierungsreaktionen in Frage kam und in einer Konzentration von 2 µM dem Inkubationsansatz zugegeben wurde, führte zu enzymunabhängiger Reaktion. Die Rf-Werte der Produkte nach DC auf Polygram Sil N-HR/UV im Laufmittel II entsprachen mit 0,23 und 0,49 denen von Mono- und Diacetylcadaverin (vergl. Tabelle 4).

Die für die im folgenden beschriebene Inkubation verwendete Kultur hatte im Sideramintest I eine Extinktion von E_{405} = 0,3. Der Testansatz enthielt:

0,1 ml MgCl (0,2 M)

0,1 ml [1,5-^{14}C] -Cadaverin (0,1 µCi)

5,0 ml zellfreien Proteinextrakt (2,8 mg Protein/ml)

Unter leichtem Umschütteln wurde die Inkubationsmischung bei 30°C im Wasserbad 30 Min inkubiert. Durch Zugabe von 30 ml Methanol wurde die Reaktion abgebrochen, der Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Reaktionsgemisch wurde in zwei DC-Trennsystemen und durch Dünnschichtelektrophorese charakterisiert.
Nach einer ersten DC auf Kieselgel-Platten 60 F_{254} im Laufmittel VI zeigten sich drei Banden auf dem Radiogramm (Abb. 3).

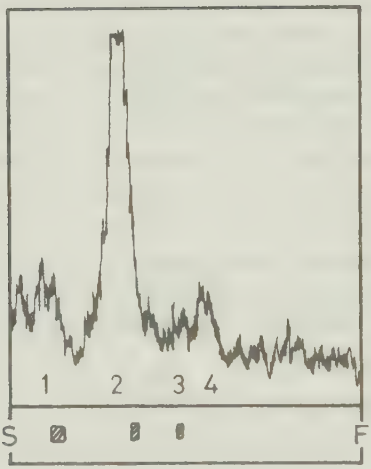


Abb. 3 : Inkubation von zellfreien Extrakten mit [1,5-^{14}C]-Cadaverin. Radiogramm nach erster DC im Laufmittel VI auf Kieselgel 60 F_{254}.

1, 2, 3, 4 - zu identifizierende Banden (Rf-Werte: 0,11, 0,32, 0,50, 0,58)

⊘ - positive Ninhydrin-Reaktion

S, F - Start, Front

Die Bande stärkster Radioaktivität (2) hat einen Rf-Wert von 0,32. Diese Laufstrecke entspricht der von Arthrobactin (s. Tabelle 6), wie auch durch Co-Chromatographie gezeigt werden konnte. Eine Ninhydrin-positive Komponente mit dem Rf-Wert 0,36 liegt ebenfalls im Bereich dieser radioaktiven Bande.
Von den anderen Reaktionsprodukten 1, 3 und 4 konnte bei einem Vergleich mit Cadaverin und seinen Acetylierungsprodukten angenommen werden, daß eine Ninhydrin-positive Komponente von Bande 1 der Vorstufe Cadaverin zuzuordnen ist. Peak 3 zeigte ebenfalls eine positive Ninhydrin-Reaktion und entspricht darin wie auch in dem Rf-Wert von 0,49 dem Monoacetylcadaverin. Bande 4 (Ninhydrin-negativ) ließ sich nicht zuordnen. Die Rf-Werte der Reaktionsprodukte nach DC im Laufmittel VI sind der Legende in Abb. 3 zu entnehmen.

Die Hauptbande 2 wurde ausgekratzt und mit 4 ml Wasser 1 Std bei 60°C im Wasserbad eluiert (Kobayashi und Harris). Nach Zentrifugieren wurde der Überstand am Rotationsverdampfer eingeengt. Es wurde $FeCl_3$ zugegeben (10 µg), das das Eluat leicht rötlich färbte. Dünnschichtchromatographie mit Arthrobactin als Vergleich zeigte im Laufmittel I eine Aufspaltung der Radioaktivität, bei der die Hauptkomponente am Start blieb (Rf-Wert: 0,03), während die zweite Bande in sehr geringer Konzentration einen Rf-Wert von 0,33 zeigte. Keiner der beiden Rf-Werte stimmt mit dem von Arthrobactin (Rf-Wert: 0,15; s. Tabelle 6) überein.

Zur weiteren Charakterisierung der Reaktionsprodukte wurde der Vergleich mit den Hydrolyseprodukten nach einer im methodischen Teil beschriebenen Dünnschichtelektrophorese bei pH 3,3 herangezogen. Im Radiogramm (Abb. 4) sind drei Aktivitäten zu erkennen, von denen der Hauptpeak in der Nähe des Startpunktes mit 5 numeriert wurde.

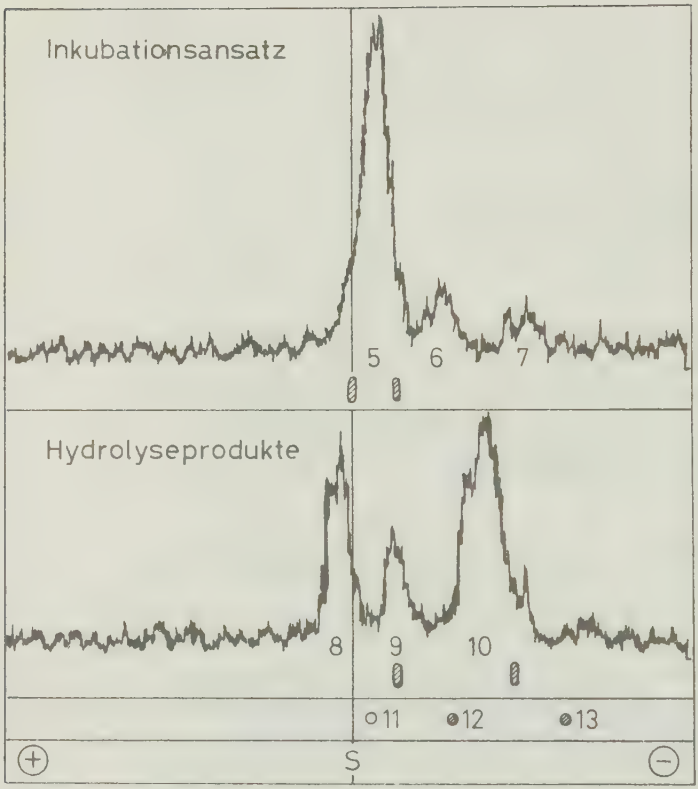


Abb. 4 : Radiogramm des Inkubationsansatzes und der Hydrolyseprodukte nach Dünnschichtelektrophorese bei pH 3,3.

5, 6, 7	-	zu identifizierende Banden
8, 9, 10	-	Hydrolyseprodukte des Arthrobactins
11	-	Diacetylcadaverin (Laufstrecke: -0,6 cm)
12	-	Monoacetylcadaverin (Laufstrecke: -3,0 cm)
13	-	Cadaverin (Laufstrecke: -6,8 cm)
⊘	-	positive Ninhydrin-Reaktion
S	-	Start

Die Banden 6 und 7 wandern in Richtung Kathode.
Die Elektrophorese zeigt im Vergleich mit den vorhandenen Referenzverbindungen deutlich, daß es sich bei dem Hauptpeak nicht um die im in vitro Test eingesetzte Vorstufe Cadaverin handelt, die demnach weitgehend umgesetzt sein muß. Dieses Ergebnis ist verständlich, da im Test nur 0,1 µCi Cadaverin eingesetzt wurden. Es ist möglich, daß es sich bei Peak 7 um einen kleinen Rest von Cadaverin handelt, dessen Rf-Wert wegen des hohen Salzgehaltes der Probe verringert ist. Bei der Substanz im Hauptpeak 5 kann es sich auch nicht um Monoacetylcadaverin oder N-Hydroxycadaverin handeln, die, wie in Abb. 4 dargestellt ist, unter den gewählten Bedingungen etwa 3 - 3,5 cm in Richtung Kathode wandern (Banden 12 und 10). Der Peak 6 dagegen könnte aus gleichen Gründen wie bei Bande 7 eine geringere Laufstrecke aufweisen und demnach Monoacetylcadaverin oder N-Hydroxycadaverin enthalten. Für N-Acetyl-N-hydroxy-cadaverin, das uns als Vergleich nicht zur Verfügung stand, muß eine ähnliche Wanderungsstrecke erwartet werden. Wegen der geringen Substanzmengen in den Peaks 6 und 7 wurde diese Möglichkeit nicht weiter geprüft.

Bei dem Hauptprodukt des Inkubationsansatzes, in der DE Peak 5, das sich mit Ninhydrin nicht anfärben läßt, muß es sich um eine bei pH 3,3 nahezu neutrale Verbindung handeln, die nicht identisch ist mit allen von uns erwarteten möglichen Intermediärprodukten der Biosynthese des Arthrobactins. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, daß die Ninhydrin-positive Komponente von Bande 5 der Bande 9 im Hydrolyseprodukt entspricht.

Die Rf-Werte des Hauptproduktes seien in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 7 : Rf-Werte des Hauptproduktes in verschiedenen Laufmittelsystemen (Kieselgel 60 F_{254})

Laufmittel	I	III	VI	Laufstrecke nach DE* [cm]
	0,03	0,20	0,32	- 0,5

* - : in Richtung Kathode

3.1.3. In vivo Einbau mit Streptomyces glaucescens

S. glaucescens produziert neben Ferrioxamin B das lipophilere Ferrioxamin E, dessen Ähnlichkeit in den Strukturkomponenten (Diaminopentan, Bernsteinsäure) mit denen des Arthrobactins der Grund für die Überlegung war, daß gleiche Biosynthesewege für diese Sideramine vorhanden sein könnten. Nachdem sich herausgestellt hatte, daß Cadaverin bei der Bildung des Arthrobactins die direkte Vorstufe ist, lag es nahe zu prüfen, ob auch bei S. glaucescens in der Biosynthese des Ferrioxamins zunächst eine Decarboxylierung des Lysins erfolgt, um erst dann oder nach Derivatisierung dieser Aminosäure eine Verknüpfung mit der Säurekomponente anzuschließen.
Um die Einbauversuche in vivo durchführen zu können, mußte zunächst die Sideraminbildung optimalisiert und in Abhängigkeit von dem Wachstumsverlauf bestimmt werden. Für eine Berechnung des Einbaus in Ferrioxamin E war auch die Bestimmung des Anteiles von Ferrioxamin E am Gesamtsideramin erforderlich.

Optimalisierung der Sideraminbildung und Bestimmung des Gehaltes an Ferrioxamin E

Nach Anzucht einer Vorkultur auf Medium 19 wurde bei 10% Beimpfung der Medien 14, 38, SS und E (150 ml Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich) bei 27°C und 120 UpM auf der Schüttelmaschine inkubiert. Die Sideraminbildung wurde mit Testmethode II verfolgt. Nach 80 Std Wachstum zeigte sich in Medium 14 ein Produktionsoptimum. Für die folgenden Versuche wurde der Stamm nach der im Methodenteil angegebenen Vorschrift fermentiert,der Verlauf der Sideraminbildung ist in Abb. 5 zu sehen. Da zwei Maxima bei 436 nm erscheinen, muß der Zugabezeitpunkt so gewählt werden, daß die

erste Produktionsphase vollständig durchlaufen ist.

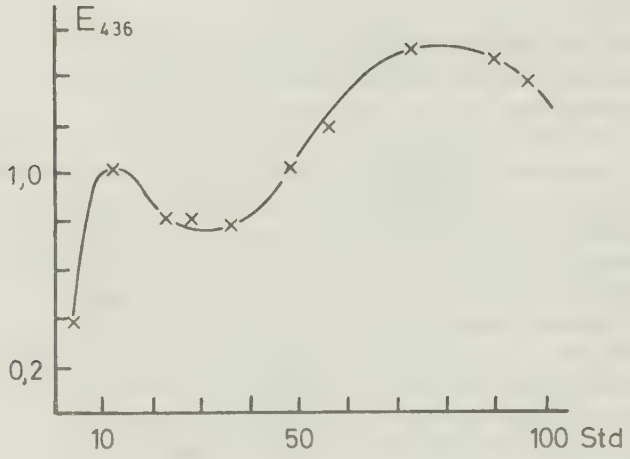


Abb. 5 : Sideraminbildung bei Streptomyces glaucescens in Medium 14

Um die Anteile von Ferrioxamin B und E am Gesamtsideramin bestimmen zu können, wurde das Sideramingemisch durch Extraktion mit Chloroform/Phenol isoliert und einer 30stufigen Craig-Verteilung im Lösungsmittelsystem Butanol:Benzylalkohol:0,001 N HCl : ges. NaCl in H_2O (10:5:15:3) unterzogen (Diekmann, 1974). Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mit Äther ausgeschüttelt und die Konzentrationen an Sideramin über die Extinktion bei 436 nm bestimmt. Ferrioxamin E besitzt einen Verteilungskoeffizienten von K = 1,59 und befindet sich in den Fraktionen 15 - 25. Nach der spektralphotometrischen Bestimmung der Sideraminkonzentration in den Fraktionen 1 - 14 und

15 - 25 betrug der Anteil des Ferrioxamin E am Gesamtsideramin 50%.

Einbau von [1,5-^{14}C]-Cadaverin und [4,5-^{3}H]-DL-Lysin in Ferrioxamin E bei Streptomyces glaucescens

Zu Beginn der Sideraminbildung (28 Std nach Animpfen der Kultur, bei einer Extinktion von 0,8 bei 436 nm, bestimmt nach Sideramintestmethode II) wurden zu 150 ml Medium 14 je 1 µCi [1,5-^{14}C]-Cadaverin und [4,5-^{3}H]-DL-Lysin (spezifische Aktivität: 3,27 mCi/mMol) gegeben.
Nach 30 Std Inkubation wurden die Sideramine durch Ausschütteln mit Chloroform/Phenol extrahiert und dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel 60 F_{254} in Laufmittel I gereinigt. Die Bande von Ferrioxamin E wurde mit Methanol eluiert, ihre Konzentration photometrisch bei 436 nm bestimmt und ein Aliquot im Flüssigscintillationszähler gezählt.
Bei der Berechnung des Einbaus wurde berücksichtigt, daß nur 50% der gesamten vom Organismus gebildeten Sideramine auf Ferrioxamin E entfallen.

Einbau von [1,5-^{14}C]-Cadaverin in Ferrioxamin E : 11%
Verdünnungsfaktor: 644

Einbau von [4,5-^{3}H]-DL-Lysin in Ferrioxamin E : 4%
Verdünnungsfaktor: 955

In Tabelle 8 sind die Versuchsdaten zusammengefaßt. Sie zeigen, daß auch von S. glaucescens Cadaverin besser in das Sideramin eingebaut wurde als Lysin.

Tabelle 8 : Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in Ferrioxamin E

Vorstufe *	Menge	E_{436} bei Zugabe	Inkubationszeit	spezifische Aktivität d. Ferrioxamin E	Verdünnungsfaktor	Einbau**
	µCi		Std	µCi/mMol		%
[^{14}C] -Cadaverin	1	0,88	30,5	5,09	644	11
[^{3}H] -DL-Lysin	2			3,42	955	3

* [1,5-^{14}C] -Cadaverin (spezifische Aktivität: 3,27 mCi/mMol)
[4,5- ^{3}H] -DL-Lysin (spezifische Aktivität: 3,27 mCi/mMol)

** unter Berücksichtigung, daß der Anteil des Ferrioxamin E am Gesamtsideramin zum Zeitpunkt des Versuchsabbruchs 50% beträgt.

3.2. Versuche mit Citronensäure und Bernsteinsäure

Die Versuche zum Einbau der Aminkomponenten des Arthrobactins bestätigen die Überlegung, daß das Sideramin aus den Aminosäurederivaten und der organischen Säure oder deren Vorstufen zusammengesetzt wird. Deshalb lag es nahe, zu prüfen, ob auch die Citronensäure in Arthrobactin eingebaut werden kann. Es sollten Bedingungen gefunden werden, die bei den Citronensäure- wie auch bei den Bernsteinsäure-haltigen Sideraminen eine Bearbeitung der Säure-aktivierung und des Mechanismus der Verknüpfung von Aminosäurederivat und Säurekomponente möglich machen. Der Einbauversuch wurde, wie schon bei dem Einbau anderer Vorstufen beschrieben, durchgeführt.

3.2.1. In vivo Einbau von Citronensäure in Arthrobactin

Zu Beginn der Sideraminbildung (E_{405} = 0,08) wurde den in 150 ml Medium wachsenden Zellen von A. pascens 1 µCi [1,5-^{14}C]-Citronensäure (spezifische Aktivität: 20,2 mCi/mMol) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Std auf der Schüttelmaschine wurde das Arthrobactin wie beschrieben mit Chloroform/Phenol isoliert, elektrophoretisch gereinigt und seine Radio-aktivität bestimmt.

Einbau von [1,5-^{14}C]-Citronensäure in Arthrobactin: 2%
Verdünnungsfaktor: 4440

Wie in den vorangegangenen in vivo Einbauversuchen wurde auch hier der Einbau prozentual errechnet und auf die Menge des bei Abbruch der Inkubation

gebildeten Sideramins bezogen. In Tabelle 9 sind die Versuchsdaten zusammengefaßt.

Tabelle 9 : Einbau von [1,5-^{14}C] -Citronensäure (spezifische Aktivität: 20,2 mCi/mMol) in Arthrobactin

E_{405} bei Zugabe	Inkubationszeit	spezifische Aktivität d. Arthrobactins	Verdünnungsfaktor	Einbau*
	Std	µCi/mMol		%
0,08	5	0,45	4440	2

*bezogen auf die Menge Arthrobactin bei Abbruch der Inkubation

3.2.2. Wachstum von Arthrobacter pascens auf Citrat als einziger C-Quelle

Die geringe Radioaktivität in Arthrobactin nach Inkubation der Zellen mit [1,5-^{14}C] -Citronensäure ließ vermuten, daß entweder diese Substanz keine Vorstufe in der Biosynthese darstellt oder von den Zellen nicht aufgenommen werden kann. Aus diesem Grunde wurde zunächst geprüft, ob der Organismus auf Citrat als einziger C-Quelle wachsen kann. Ein qualitativer Test, bei dem Zellen auf Simmons-Citrat-Agar ausgestrichen wurden und die Verwertung von Citrat einen Farbumschlag des Indikators von grün nach blau bewirkt, zeigte, daß A. pascens Citrat nicht

verwerten kann. Dieses Ergebnis wurde noch durch Untersuchung des Wachstums in Koser-Citrat-Medium bestätigt. Je 150 ml Minimalmedium, Koser-Citrat-Medium und Koser-Citrat-Medium mit Zusatz von 0,5 g Glucose/l wurden mit 1% und 6% einer 20 Std alten gewaschenen Vorkultur beimpft. Das Wachstum wurde durch Trübungsmessung bestimmt. Dabei zeigte sich, daß selbst bei einem Inoculum von 6% und Zugabe von 0,5 g Glucose/l die Zellen nur bis zu einer Trübung von E_{578} = 1,0 anwuchsen, während Kulturen in Minimalmedium nach 24 Std bei beiden Inocula eine Trübung von 10,0 aufwiesen. Die minimale Zunahme der Zellzahl läßt sich nicht als Wachstum auf Citrat interpretieren.

3.2.3. Transport von Citronensäure in Arthrobacter pascens vor und nach Induktion durch Citrat

Da A. pascens nicht auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle wächst, war zu prüfen, ob Citronensäure überhaupt von den Zellen aufgenommen wird.
Mit 10 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur (E_{578} = 4,9, E_{405} = 0,19) wurde ein Transportversuch nach der von Monod und Mitarbeitern beschriebenen Methode durchgeführt. Die Trübung der verwendeten Zellsuspension betrug E_{578} = 1,35, die spezifische Aktivität der eingesetzten [1,5-^{14}C] -Citronensäure 8,2 mCi/mMol. Die Radioaktivität wurde nach Abbruch der Inkubation zu verschiedenen Zeiten durch Messung der Membranfilter im Flüssigscintillationszähler bestimmt.
Die verbliebene Kultur wurde steril zentrifugiert und in Koser-Citrat-Medium wieder aufgenommen. Nach zweistündiger Inkubation bei 27°C und 120 UpM auf der Schüttelmaschine wurde mit dieser Kultur nach der gleichen Methode und einer ebenfalls auf eine Trübung

von 1,35 bei 578 nm eingestellten Zelldichte die Aufnahme von Citronensäure bestimmt. Die Menge der in Abhängigkeit von der Zeit von den Zellen aufgenommenen Citronensäure vor und nach Induktion eines Transportsystems ist aus Abb. 6 abzulesen. Nur nach Induktion wird Citronensäure von den Zellen aufgenommen.

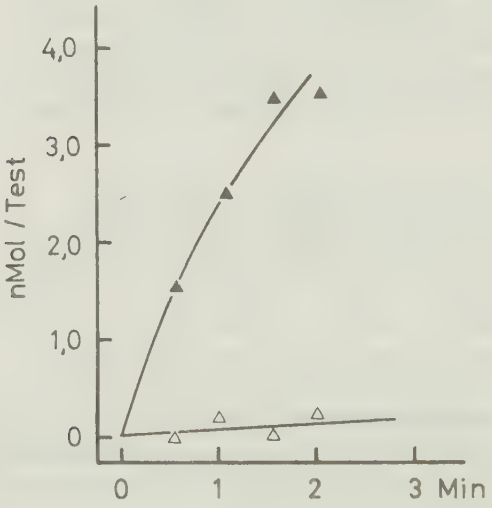


Abb. 6 : Aufnahme von [1,5-^{14}C] -Citronensäure in Zellen von Arthrobacter pascens vor (-△-) und nach (-▲-) Induktion eines Transportsystems

3.2.4. Wachstum von Klebsiella pneumoniae auf Citrat als einziger C-Quelle

Bergey (1974) beschreibt K. pneumoniae, den Produzenten von Aerobactin und Enterochelin, als Citrat-verwertend. Um dies zu überprüfen, wurde das Wachstum auf Citrat zunächst in einem qualitativen Test mit Simmons-Citrat-Agar bestimmt. Der Versuch mit K. pneumoniae führte zu einer Verwertung von Citrat. Um dieses Ergebnis quantitativ zu stützen, wurde ein Vergleich des Wachstums in Minimalmedium, Koser-Citrat-Medium und Koser-Citrat-Medium mit Zusatz von 0,5 g Glucose/l angestellt. Je 150 ml Medium in 500 ml-Erlenmeyerkolben wurden mit 1% oder 6% einer 20 Std alten gewaschenen Vorkultur beimpft und bei 37°C und 180 UpM auf der Schüttelmaschine inkubiert. In Abb. 7 ist das Wachstum in den verschiedenen Medien in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt. Daraus läßt sich ablesen, daß die Zellen bei geringem Inoculum im Citrat-Medium gut anwuchsen. Die Zugabe der Glucose bewirkte noch eine Steigerung der Zelldichte um 100% gegenüber Citrat-Medium ohne Zusatz. In beiden Ansätzen wurde jedoch die Trübung der Kultur in Minimalmedium nicht erreicht.

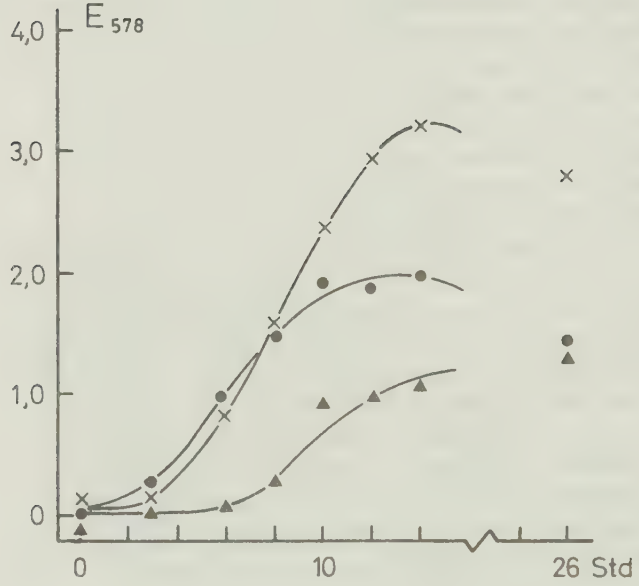


Abb. 7 : Wachstum von Klebsiella pneumoniae auf
Minimalmedium (- x -)
Koser-Citrat-Medium + 0,5 g Glucose/l (- ● -)
Koser-Citrat-Medium (- ▲ -)
Inoculum: 1% der Vorkultur

3.2.5. In vivo Einbau von Bernsteinsäure in Ferrioxamin E

Wie schon bei A. pascens der Einbau von Citronensäure in Arthrobactin bestimmt wurde, so sollte auch, um eventuelle Parallelen in den Synthesewegen der Sideramine aufzeigen zu können, bei S. glaucescens der Einbau von Bernsteinsäure als Bestandteil des Ferrioxamin E überprüft werden. Dabei blieben zunächst die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche unberücksichtigt, da angenommen wurde, daß bei dem Streptomyceten andere Transportverhältnisse vorliegen.

Einer 20 Std alten Kultur (E_{436} = 0,88, Sideramintestmethode II) wurde 1 µCi [2,3-^{3}H] -Bernsteinsäure zugegeben. Um die Syntheseaktivität der Kultur zu bestätigen, wurde im gleichen Ansatz der Einbau von [1,5-^{14}C] -Cadaverin bestimmt. Beide Verbindungen hatten eine spezifische Aktivität von 3,27 mCi/mMol. Nach 30,5 Std Inkubation auf der Schüttelmaschine wurde der Einbau durch Zugabe von Eisenionen und Extraktion der Sideramine abgebrochen. Die Konzentration der elektrophoretisch gereinigten Sideramine wurde bestimmt und ein Aliquot im Scintillationszähler gezählt.

Einbau von [2,3-^{3}H] -Bernsteinsäure in Ferrioxamin E: 0,6%
Verdünnungsfaktor: 12400

Einbau von [1,5-^{14}C] -Cadaverin in Ferrioxamin E: 14%
Verdünnungsfaktor: 501

Das Ergebnis ist in Tabelle 10 aufgestellt und zeigt deutlich den minimalen Einbau der Bernsteinsäure, während Cadaverin mit einem Verdünnungsfaktor eingebaut wurde, der dem des unter 3.1.3. beschriebenen Einbauversuchs (Tabelle 8) entspricht.

Tabelle 10 : Einbau von [2,3-^{3}H] -Bernsteinsäure und [1,5-^{14}C] -Cadaverin in Ferrioxamin E.

Vorstufen *	Menge	E_{436} bei Zugabe	Inkubationszeit	spezifische Aktivität d. Ferrioxamin E	Verdünnungsfaktor	Einbau **
	µCi		Std	µCi/mMol		%
[^{3}H] -Bernsteinsäure	1	0,88	30,5	0,26	12400	0,6
[^{14}C] -Cadaverin	1			6,53	501	14

* [1,5-^{14}C] -Cadaverin (spezifische Aktivität: 3,27 mCi/mMol)
[2,3-^{3}H] -Bernsteinsäure (spezifische Aktivität: 3,27 mCi/mMol)

** bezogen auf 50% des Sideramingehaltes bei Inkubationsabbruch

3.3. Bestimmung der Lysindecarboxylase-Aktivität

Aminosäuredecarboxylasen lassen sich in tierischen und pflanzlichen Geweben wie auch in Mikroorganismen nachweisen (Boeker und Snell, 1972). Bei neueren Untersuchungen schreibt man den Polyaminen eine wichtige Funktion bei der Neutralisierung negativer Ladungen an Nukleinsäuren und Membranen zu; in beiden Fällen scheinen sie ähnliche Funktionen wie Magnesiumionen zu übernehmen (Cohen und Lichtenstein, 1960; Martin und Ames, 1962; Silver et al., 1970; Bachrach, 1973).
Unsere Einbauversuche ließen vermuten, daß bei der Arthrobactin-Biosynthese die Lysindecarboxylase eine wichtige Rolle spielt. Da die Regulation eines Stoffwechselweges in vielen Fällen am ersten Enzym nach der Abzweigung aus dem Primärstoffwechsel erfolgt (Bu'Lock, 1965) und Sideramine nur unter Eisenmangel gebildet werden, sollte geprüft werden, ob Eisen(III)-ionen die Lysindecarboxylase regulieren können.

3.3.1. In vivo Versuche mit Arthrobacter pascens, Streptomyces glaucescens und Klebsiella pneumoniae

Lysindecarboxylase-Aktivität ließ sich bei A. pascens qualitativ mit der Methode von Costin (1968) nachweisen. Dabei zeigte der beimpfte Nährboden schon nach 5 Std Wachstum die Bildung von Cadaverin durch den mit der pH-Änderung verbundenen Farbumschlag des Indikators an.

Zum quantitativen Nachweis wurde ein Testsystem entwickelt, bei dem, wie in Material und Methoden beschrieben, die Enzymaktivität durch Messung des abgespaltenen CO_2 bestimmt werden konnte.
In ersten Versuchen wurde die Zeitabhängigkeit der Decarboxylierungsreaktion in vivo mit Zellen von A. pascens bestimmt. Je 2 ml einer 20 Std alten Kultur (E_{578} = 7,5;

E_{405} = 0,25) wurden in Warburggefäßen mit [1-^{14}C]-DL-Lysin inkubiert. Nach Abbruch der Reaktion durch Zugabe von Trichloressigsäure zeigte die Radioaktivitätsbestimmung im Hyamin einen zeitabhängigen, linearen Reaktionsverlauf. Nach 10 Min waren 7,5 nMol Lysin, 26 % der eingesetzten Radioaktivität, decarboxyliert worden.

In Tabelle 11 sind Ergebnisse zusammengefaßt, die einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Lysindecarboxylaseaktivität und Eisenionen in vivo gaben. Es wurde eine unter Eisen-Überschuß (1,84 mM Eisen(III)-chlorid) gewachsene Kultur untersucht. 2 ml der Zellsuspension (E_{578} = 13,4; E_{405} = 0,02) wurden wie beschrieben mit markiertem Lysin 20 Min inkubiert. Die im Hyamin nachgewiesene Radioaktivität (90 dpm) lag mit 0,3 % (0,019 nMol Lysin) der eingesetzten Radioaktivität im Bereich der Nachweisgrenze.

Bei Zugabe von Eisen(III)-chlorid (2,4mM) zum Testansatz einer in Minimalmedium ohne Zusatz gewachsenen 20 Std alten Kultur von A.pascens wurde nach 10 Min Inkubation in dieser wie auch der zum Vergleich ohne Eisenzugabe geprüften Kultur etwa 11 % der Radioaktivität des eingesetzten Substrates als CO_2 im Hyamin nachgewiesen.

Tabelle 11: Hemmung der Lysindecarboxylase bei A. pascens durch Eisen(III)-chlorid in vivo

	Minimalmedium				Testansatz	
$FeCl_3$ [mM]	-		1,84		2,4	
E_{578}	6,1		13,4		6,1	
E_{405}	0,22		0,02		0,22	
Testabbruch nach Min	1	10	5	20	1	10
Lysin [nMol/Test]	0,39	5,9	0,013	0,019	0,42	6,9

Bei S.glaucescens, bei dem wegen des guten Einbaus von Cadaverin auch eine Lysindecarboxylase vermutet wurde, führte der qualitative Test, der zur Differenzierung von Enterobacteriaceen entwickelt und auf deren Wachstumsbedürfnisse zugeschnitten ist, zu einem negativen Ergebnis.
Im quantitativen Nachweisverfahren ließ sich jedoch eine zeitabhängige Decarboxylierungsreaktion feststellen. Es wurden pro Ansatz 2 ml einer 28 Std alten Kultur (E_{436} = 1,5; Sideramintest II) gewaschen, in Saline resuspendiert und mit Substrat inkubiert. Nach 10 Min wurde ein Umsatz von 0,5 nMol Lysin/mg Trockengewicht (16 % der eingesetzten Radioaktivität) bestimmt. Die Reaktion verlief bei der verwendeten Zelldichte bis zu 15 Min linear.
Die Lysindecarboxylase-Aktivität wurde auch bei einer unter Eisen-Überschuß (1,84 mM Eisen(III)-chlorid) gewachsenen Kultur (E_{436} = 0,61) geprüft. Dabei stellte sich, wie in Tabelle 12 aufgeführt, heraus, daß nach 10 Min 0,64 nMol Lysin (2 % des eingesetzten radioaktiven Substrates) umgesetzt worden waren.

Tabelle 12: Hemmung der Lysindecarboxylase bei S. glaucescens durch Eisen(III)-chlorid in vivo

	Minimalmedium				Testansatz	
$FeCl_3$ [mM]	-		1,84		1,58	
E_{436}	1,45		0,61		1,45	
Testabbruch nach Min	1	10	1	10	1	10
Lysin [nMol/Test]	0,037	4,76	0,018	0,64	0,028	3,24

Die Zeitabhängigkeit wurde durch Messung von Vergleichswerten nach 1 Min Inkubation bestätigt und betrug zwischen 80 und 160 dpm (0,05 % und 0,1 % Umsatz).
Zugabe von 1,58 mM Eisen(III)-chlorid zum Testansatz mit unter Standardbedingungen gewachsenen Kulturen zeigte einen Umsatz von 11 % (3,24 nMol Lysin), während die Vergleichskultur 16 % (4,76 nMol Lysin) des Substrates decarboxyliert hatte.

Die Biosynthese bei dem von K.pneumoniae gebildeten Aerobactin, dessen Aminosäurekomponente Lysin unter Beibehaltung der Carboxylgruppe mit Citronensäure verknüpft ist, schließt eine Lysindecarboxylase-Aktivität während der Sideraminbiosynthese aus.
Es wurde mit 2 ml Kultur dieses Organismus (E_{578} = 3,1; E_{436} = 0,18) ein Lysindecarboxylasetest durchgeführt. Nach 30 Min Inkubation waren 2 % des eingesetzten Substrates umgesetzt, ein Wert, der 0,335 nMol decarboxyliertem Lysin entspricht.

3.3.2. In vitro Versuche mit Arthrobacter pascens

Um über den Einfluß von Eisen(III)-ionen auf die Lysindecarboxylase-Aktivität quantitative Aussagen machen zu können, wurde ein in vitro Nachweis der Lysindecarboxylase notwendig. Dazu war es zunächst erforderlich, die Versuchsbedingungen zum Nachweis des Enzyms nach Zellaufschluß durch Ultraschall durch Bestimmung von pH-, Zeit- und Proteinabhängigkeit zu optimieren.
Für den Ultraschallzellaufschluß, der im methodischen Teil beschrieben wurde, fanden Kulturen Verwendung, die durch Trübungsmessung und Bestimmung der Sideraminkonzentration charakterisiert waren. Als Standardbedingung wurde eine 20 Std alte Kultur in Minimalmedium verwendet, die mit 1 % einer 20 Std alten Vorkultur beimpft worden war und sich bei der Sideraminbildung im logarithmischen

Anstieg befand. Die Proteinbestimmung des Zellextraktes wurde nach der Methode von Warburg und Christian (1941/1942) durchgeführt. Da bakterielle Aminosäuredecarboxylasen mit Ausnahme von Histidindecarboxylase aus Lactobacillus und Adenosylmethionindecarboxylase aus Escherichia coli Pyridoxalphosphat als Cofaktor benötigen (Boeker und Snell, 1972),wurde diese Verbindung dem Testansatz zugegeben.

pH-Abhängigkeit

Zellen einer 20 Std alten Kultur (E_{578} = 7,5; E_{405} = 0,32) wurden nach der beschriebenen Methode, jedoch unter Verwendung von Puffer C, aufgeschlossen. Die pH-Werte der Proteinlösungen wurden durch Zugabe von 1M Pufferlösungen verschiedener pH-Werte (Puffer B und E) eingestellt, nachdem zuvor der Proteinlösung Pyridoxal-5'-phosphat (10^{-5} M) zugesetzt worden war. Die Inkubationszeit der zellfreien Extrakte mit dem radioaktiv markierten Substrat betrug 30 Min. Abb. 8 zeigt, daß bei pH 7,6 ein Optimum der Lysindecarboxylase-Aktivität vorliegt.

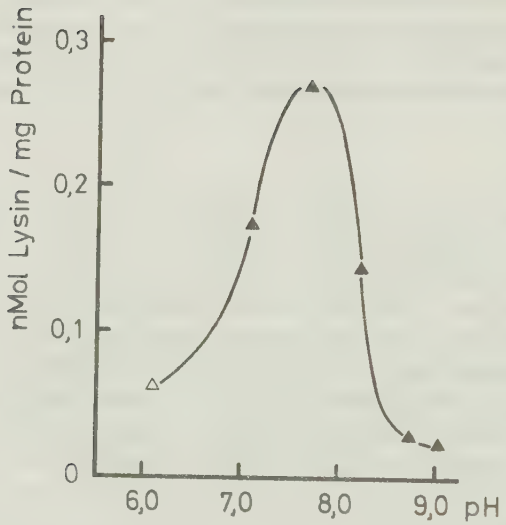


Abb. 8: pH-Abhängigkeit der Lysindecarboxylase-Aktivität
- ▲ - in Tris-HCl-Puffer
- △ - in Kalium-Phosphat-Puffer

Zeit- und Proteinabhängigkeit

Eine 20 Std alte Kultur (E_{578} = 1,0; E_{405} = 0,54) wurde für den Zellaufschluß in Puffer A verwendet.
Der Testansatz enthielt hier wie in allen folgenden Versuchen:

0,1 ml Pyridoxal-5'-phosphat 10^{-5}M
0,1 ml $MgCl_2$ 0,2 M
0,05 ml [1-^{14}C]-DL-Lysin (etwa 70000 dpm)
1,75 ml Proteinlösung

In sechs Ansätzen wurde die Umsetzung des Lysins nach verschiedenen Inkubationszeiten abgebrochen und die von Hyamin absorbierte Radioaktivität bestimmt. Abb. 9 zeigt die Zeitabhängigkeit der Decarboxylierungsreaktion. Bis zu 30 min war der Reaktionsverlauf linear. Der Umsatz von 1,12 nMol Lysin/mg Protein nach 30 Min entsprach 29 % der eingesetzten Radioaktivität.

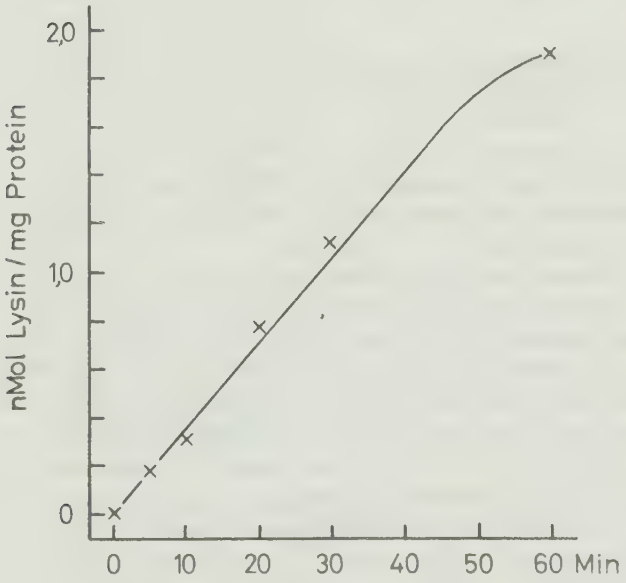


Abb. 9: Zeitabhängigkeit der Lysindecarboxylase-Aktivität

Die Bestimmung der Proteinabhängigkeit war in dem verwendeten quantitativen Testverfahren limitiert durch die Konzentration an radioaktivem Substrat. Die Zeitabhängigkeit, mit einer Proteinkonzentration von 3,24 mg/ml bestimmt, zeigte bei Zugabe von 24 nMol des racemischen Substrates einen linearen Verlauf über eine Inkubationsdauer von mehr als 30 Min. Bei Verwendung niedrigerer Protein- und Substratkonzentrationen wurde die Linearität der Proteinabhängigkeit im Test bestätigt. Bei 10 Min Inkubation von 7,5 nMol Substrat wurde im Bereich von 0,25 und 2,8 mg Protein/Test ein linearer Reaktionsverlauf nachgewiesen.
In den folgenden Versuchen wurde der Rohextrakt mit Proteinkonzentrationen zwischen 2,2 und 3,4 mg/ml verwendet und 30 Min inkubiert.

Test der Lysindecarboxylase-Aktivität mit ε-N-Acetyl-[1-^{14}C]-DL-Lysin als Substrat

Nach dem in vivo Einbau von [Acetyl-^{14}C]ε-N-Acetyl-L-lysin in Arthrobactin bestand die Möglichkeit einer Decarboxylierung des acetylierten Lysins während der Arthrobactin-Biosynthese.
Um in vitro eine Decarboxylierung des acetylierten Lysins untersuchen zu können, wurde zunächst, wie in Material und Methoden beschrieben, ε-N-Acetyl-[1-^{14}C]-DL-lysin hergestellt und chromatographisch gereinigt. Der Ultraschallaufschluß einer Kultur (E_{578} = 8,2; E_{405} = 0,31) erfolgte wie beschrieben. In den Test wurden 78800 dpm ε-N-Acetyl-[1-^{14}C]-DL-lysin als Substrat eingesetzt und nach 30 Min die umgesetzte Radioaktivität gemessen. Der Umsatz betrug 3,66 nMol Substrat/mg Protein.
Legt man den K_m-Wert von 3,7 x 10^{-4}, der für die aus Bacterium cadaveris isolierte Lysindecarboxylase bestimmt wurde, zugrunde (Soda und Moriguchi, 1969), so

erfolgte die Decarboxylierung im Bereich der Substratsättigung des Enzyms.

Bestimmung der Lysindecarboxylase-Aktivität bei unterschiedlich belüfteten Kulturen

Frühere Beobachtungen hatten gezeigt, daß A.pascens bei schlechter Versorgung mit Sauerstoff mit geringem Wachstum und niedriger Sideraminausbeute reagierte. Es sollte daher geprüft werden, ob bei geringer Belüftung der Kulturen Lysindecarboxylase-Aktivität und Sideraminbildung parallel vermindert sind.
Für diesen Versuch wurden Erlenmeyerkolben mit und ohne Schikane mit verschiedenen Füllmengen verwendet, die Zellen nach unterschiedlich langem Wachstum bei den in Tabelle 13 angegebenen Extinktionen aufgeschlossen und die Lysindecarboxylase-Aktivität bestimmt.
Tabelle 13 zeigt, daß unter allen Wachstumsbedingungen die Lysindecarboxylase aktiv war. Im Ansatz geringster Belüftung (A) hatte die Kultur noch nicht die Trübung erreicht, bei der eine Sideraminbildung nachweisbar wird. Bei einem Vergleich der Ansätze B und C zeigt sich jedoch, daß bei annähernd gleicher Inkubationsdauer und Zelldichte im Kolben mit geringerem Sauerstoffpartialdruck (B) auch weniger Sideramin gebildet worden war. In den am besten belüfteten Kulturen (C und D) sind Wachstum und Produktionsoptimum schon erreicht. In Kulturen dieses Fermentationszustandes ist die Lysindecarboxylase möglicherweise deswegen reduziert.

Tabelle 13: Lysindecarboxylase-Aktivität bei unter verschiedenen Belüftungsbedingungen gewachsenen Kulturen von A.pascens

	A	B	C	D
Schikane	-	-	+	+
Füllmenge[ml]	200	100	150	100
Inoculum [ml d. Vorkultur]	5	2	1	1
Testzeitpunkt				
E_{578}	5,5	8,9	8,0	11,0
E_{405}	0,055	0,275	0,66	0,83
nach Std	26	23	20	20
Lysin [nMol/mg Protein]	1,28	1,5	0,367	0,538

3.3.3. Vergleich des Einflusses von Eisen(III)-ionen auf die Lysindecarboxylase-Aktivität in vivo und in vitro

Im Abschnitt 3.3.1 war gezeigt worden, daß nach Zugabe von Eisen(III)-ionen zum Medium die Lysindecarboxylase-Aktivität reduziert ist. Zusatz von Eisenionen zum Test, in dem die Enzymaktivität in ganzen Zellen getestet wurde, vermindert die Aktivität des Enzyms nur geringfügig.

Es lag daher die Vermutung nahe, daß die Enzymsynthese durch Eisen(III)-ionen reprimierbar ist. Deshalb wurde die Enzymaktivität nach Aufschluß von Zellen, die in Gegenwart unterschiedlicher Eisenionenkonzentrationen gewachsen waren, in vitro gemessen. Für jede Eisenkonzentration und

für den Vergleichswert einer Eisenmangel-Kultur wurden 3 x 150 ml mit 1 % einer 20 Std alten Vorkultur beimpft. Nach 20 Std Wachstum wurde bei allen Ansätzen Trübung und Sideraminmenge bestimmt, die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und der Enzymtest bei 30 Min Inkubation wie beschrieben durchgeführt. In Abb. 10 ist der Umsatz an radioaktivem Substrat -prozentual berechnet und in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen an Eisen(III)-chlorid- aufgetragen. Der Umsatz des Extraktes von Zellen einer Kultur, die ohne Zusatz von Eisenionen gewachsen war, wurde als Bezugsgröße (100 %) verwendet. Die Testansätze der übrigen Proben enthielten gleiche Volumina der Extrakte, die durch Aufschluß von jeweils 3 g Zellen (Feuchtgewicht) erhalten wurden. Die Aktivitäten über 100 % resultieren aus den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der Ansätze.
Die Bestimmung der Eisenkonzentration nach der angegebenen Vorschrift (Abschnitt 2.19.) ergab, daß das verwendete Minimalmedium 2 $\times 10^{-7}$M Eisen(III)-ionen enthält.

Das Diagramm (Abb. 10) zeigt, daß bei Zusatz von $FeCl_3$ in einer Konzentration von 10^{-6}M noch 80 % der Enzymaktivität nachgewiesen werden können, während die Sideraminkonzentration auf 19 % (E_{405} = 0,095) des Ausgangswertes reduziert ist. Bei höheren Eisenionen-Konzentrationen (5 x 10^{-6}M) war weder Sideramin noch Enzymaktivität sichtbar.

Dem zellfreien Extrakt der als 100 %-Wert verwendeten Eisenmangel-Kultur wurden zur Bestimmung des Einflusses von Eisen(III)-ionen auf die Lysindecarboxylase-Aktivität im Test verschiedene Eisenionen-Konzentrationen zugesetzt (Abb. 10). In diesem Ansatz sind bei Zugabe von 10^{-6}M $FeCl_3$ zum zellfreien Extrakt nach 30 Min Inkubation noch 97 % Enzymaktivität nachweisbar. Bei einer Konzentration von 5 x 10^{-6}M nimmt die Lysindecarboxylase-Aktivität lang-

sam ab, und eine 50 %ige Hemmung des Enzyms wird erst bei Zugabe von 3 x 10^{-4} M $FeCl_3$ erreicht.

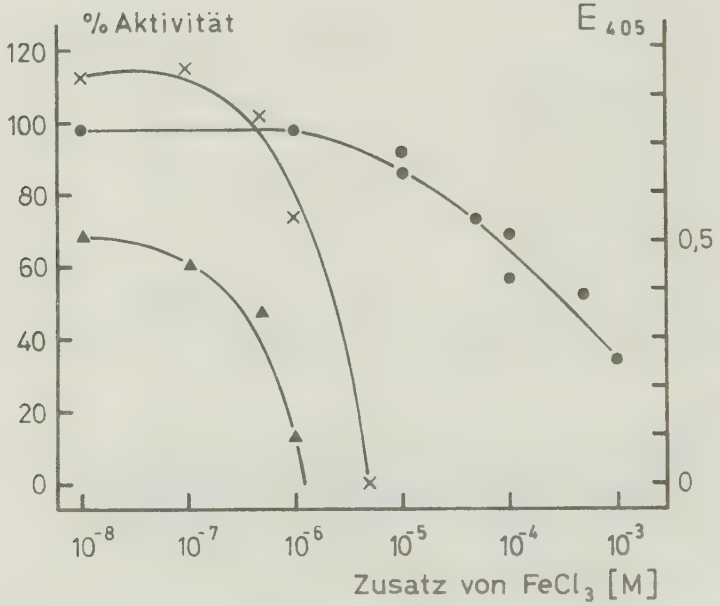


Abb. 10: Lysindecarboxylase-Aktivität in vitro und Sideraminbildung (-▲-) in Abhängigkeit vom Zusatz von Eisen(III)-ionen während des Wachstums (-x-) und zum Test (-●-)

Möglichkeit einer Induktion der Lysindecarboxylase durch Lysin

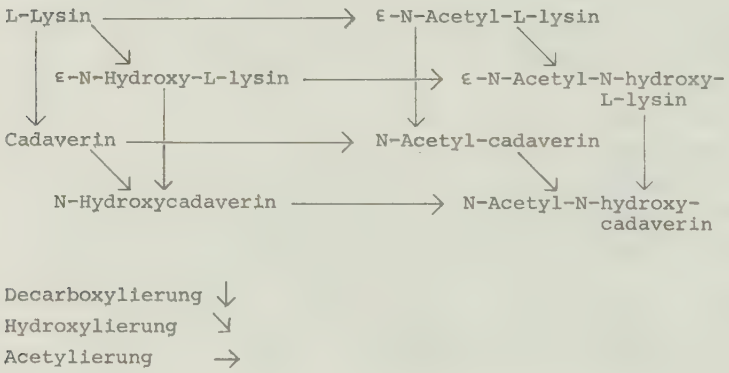
Nach den bisherigen Ergebnissen bestand noch die Möglichkeit, daß Eisenionen die Lysindecarboxylase nicht direkt reprimieren, sondern in die Lysinbiosynthese eingreifen und zu einer Verminderung der intrazellulären Lysinkonzentration führen. Das wiederum könnte die Lysindecarboxylase-Aktivität erniedrigen, wenn das Enzym durch Lysin induzierbar ist.
Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde eisenhaltiges Minimalmedium (2×10^{-6} M $FeCl_3$) mit 1 % einer 20 Std alten Vorkultur beimpft. Nach 10 Std Wachstum wurde dieser, wie auch einer eisenfreien Vergleichskultur, Lysin (6 mg/ml) zugefügt. Nach weiteren 11 Std Wachstum wurden die Zellen wie beschrieben aufgeschlossen und auf ihre Lysindecarboxylase-Aktivität untersucht. Die Inkubationszeit im Test betrug 30 Min.
Aus Tabelle 14 ist zu ersehen, daß sowohl in Gegenwart wie auch in Abwesenheit von Eisen durch Zugabe von Lysin die Lysindecarboxylase-Aktivität nicht verändert wurde. Geringe Unterschiede gegenüber den Vergleichswerten sind auf Abweichungen im Fermentationszustand zurückzuführen.

Tabelle 14: Lysindecarboxylase-Aktivität nach Zugabe von Lysin zu eisenhaltigen Kulturen

	Minimalmedium			
$FeCl_3$	-	-	+	+
Lysin	-	+	-	+
E_{578}	7,6	8,5	9,0	10,4
E_{405}	0,33	0,53	0,006	0,005
Lysin [nMol/mg Protein]	0,746	0,517	0,035	0,009

4. DISKUSSION

Zur Untersuchung der Biosynthese gingen wir von der Überlegung aus, daß Arthrobactin aus zwei gleichen Aminkomponenten und einem Molekül Citronensäure synthetisiert wird und die Verknüpfung der organischen Säure mit den schon derivatisierten Aminosäuren erfolgt. Nachdem gezeigt war, daß Lysin eingebaut wird und Lysin durch Decarboxylierung, Acetylierung oder Hydroxylierung in Zwischenprodukte umgewandelt werden kann, haben wir unseren weiteren Untersuchungen folgendes Schema möglicher Biosynthesewege bei der Bildung der Derivate zugrundegelegt:



Unsere in vivo Versuche zur Decarboxylierung haben zunächst gezeigt, daß nur L-Lysin für die Arthrobactinsynthese verwertbar ist. Offensichtlich ist keine D-Aminosäureracemase in den Zellen vorhanden und somit können, wie es auch für andere Bakterien beschrieben wurde, nur L-Aminosäuren decarboxyliert werden (Boeker und Snell, 1972).

Berücksichtigt man bei einem vergleichenden Einbau von Lysin und Cadaverin in Arthrobactin (Tabelle 2), daß nur das L-Isomere des Lysins inkorporiert wird, dann muß der prozentuale Einbau dieser Verbindung verdoppelt werden. Dennoch liegt er etwa um den Faktor 2,5 niedriger als der des Cadaverins.
Die aktive Decarboxylierung wird auch durch die Abspaltung des radioaktiven CO_2 aus [1-^{14}C]-DL-Lysin bestätigt. Gleichzeitig zeigt sich dabei auch, daß die aufgrund des Stoffumsatzes erneut eingebaute Radioaktivität vernachlässigbar gering ist.

Eine Acetylierung des Lysins als erster Schritt konnte in unseren Versuchen nicht ausgeschlossen werden. Vergleicht man den Einbau von Lysin und seinem N-Acetyl-Derivat (Tabelle 3), so liegt der Einbau von Acetyllysin mit 5 % um den Faktor 4 unter dem des Lysins, ein Ergebnis, demzufolge die Bildung von Arthrobactin über N-Acetyl-lysin möglich zu sein scheint. Dies wird auch durch die von uns in vitro nachgewiesene Decarboxylierung von ε-N-Acetyl-[1-^{14}C]-DL-lysin (3.2.2.) bestätigt.
Auch von verschiedenen anderen Autoren wurde die Existenz von N-acetyliertem Lysin im Stoffwechsel nachgewiesen. Rothstein (1965) beobachtete diese Verbindung als Intermediärprodukt bei der Dissimilation von Hefen; aus verschiedenen Bakterien wurde die Isolierung von ε-N-Acetyl-lysin mit guter Ausbeute beschrieben (Suzuki und Tomita, 1975). Aus Rinderleberzellen isolierten Paik und Kim (1964) ein Enzym, das mit Acetyl-Phosphat Lysin am endständigen Stickstoff acetyliert wie auch das von Tanaka und Soda (1974) aus K. pneumoniae extrahierte Enzym, das Lysin und Lysin-Antagonisten, nicht aber Cadaverin als Substrat umsetzt. Als Grund für die im Stoffwechsel häufig zu beobachtende Acetylierung wird bis jetzt die Detoxifikation von Stoffwechselprodukten gesehen (Meister, 1965).

Wenn auch Radioaktivität aus N-Acetyl-lysin in Arthrobactin eingebaut und N-Acetyl-lysin in vitro decarboxyliert werden konnte, so macht der hohe Einbau von Cadaverin in Arthrobactin wahrscheinlich, daß nach Abzweigung aus dem Intermediärstoffwechsel die Synthese überwiegend, wenn nicht ausschließlich, über die Decarboxylierung von Lysin läuft. Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen an Sideramin- und Cadaverin-auxotrophen Mutanten von A. pascens bestätigt (Vu, 1976): Bei Zugabe von Cadaverin wie auch von Sideraminen wuchsen die Mutanten und zeigten damit, daß alle im Genort der Lysindecarboxylase mutiert sind und Cadaverin in A. pascens keine andere Stoffwechselfunktion zukommt.
In Pflanzenzellen konnte dagegen die oxidative Desaminierung von Cadaverin bei der Bildung von Alkaloiden beobachtet werden (Clarke und Mann, 1959). Untersuchungen anderer Di- und Polyamine bei mikrobiellen Zellen befassen sich vorwiegend mit Putrescin, Spermin und Spermidin. Durch Arbeiten über die Biosynthese dieser Verbindungen und die Erkenntnisse über ihre Interaktion mit Nukleinsäuren hat diese Stoffgruppe zunehmend an Bedeutung gewonnen (Tabor et al., 1958; Tabor und Tabor, 1964; 1972; Morris und Pardee, 1966; Raina et al., 1967).

Unter der Voraussetzung, daß Lysin vor Acetylierung oder Hydroxylierung zu Cadaverin decarboxyliert wird, kommen als nächste Zwischenprodukte die N-Acetyl- oder N-Hydroxyderivate des Cadaverins in Frage. Über die Reihenfolge der Syntheseschritte bei der Bildung der charakteristischen Hydroxamsäuregruppierung liegen aus Untersuchungen über die Biosynthese anderer Sideramine unterschiedliche Ergebnisse vor, die sowohl für eine N-Hydroxylierung (Emery, 1966; Anke, 1973) als auch für eine N-Acylierung (Tateson, 1970) als ersten Schritt sprechen. In unseren in vitro Versuchen zum Nachweis

intermediär gebildeter Verbindungen (3.1.2.) ließ sich als Hauptprodukt eine Substanz isolieren, die mit keiner der möglichen vorgeschlagenen Zwischenprodukte, auch nicht mit Arthrobactin, identisch ist. Neben der Möglichkeit, daß es sich um ein unbekanntes Intermediärprodukt handelt, kommen auch andere Umsetzungsprodukte des Cadaverins in Frage.
So kann Cadaverin durch die Putrescinoxidase aus Micrococcus rubens zum Aminoaldehyd oxidiert werden (Yamada, 1971; De Sa und Brantner, 1972), der auch bei E. coli enzymatisch aus Diaminen und α-Ketoglutarsäure unter Abspaltung von Glutaminsäure entstehen kann (Kim und Tchen, 1971). Die Diamin-α-Ketoglutarat Aminotransferase setzt von den angebotenen Diaminen Cadaverin optimal um. Auch wäre eine Cyclisierung von zwei Molekülen Cadaverin denkbar, die mit pflanzlicher Diaminoxydase nachgewiesen wurde (Hasse und Maisack, 1955).

Von den in geringerer Konzentration gebildeten Verbindungen ist der Nachweis von Monoacetylcadaverin wahrscheinlich. Ob es sich bei dieser Verbindung allerdings um ein Zwischenprodukt der Arthrobactin-Biosynthese handelt, bleibt zunächst offen. Nach Beobachtungen von C.W. Tabor (1968) kann es sich bei den von verschiedenen Arbeitsgruppen aus E. coli extrahierten acetylierten Polyaminen (Dubin und Rosenthal, 1960; Raina und Cohen, 1966) um bei niedriger Temperatur gebildete Artefakte handeln. Auch unter unseren Versuchsbedingungen konnte gezeigt werden, daß Acetyl-CoA in Puffer allein zu Acetylierung von Cadaverin führt, so daß auch geringe Mengen von Acetyl-CoA in Zellextrakten Cadaverin nichtenzymatisch acylieren können. Ob Monoacetylcadaverin Intermediärprodukt ist, ließe sich durch einen in vivo Einbau prüfen.

Unsere Versuche zeigen, daß N-hydroxylierte Zwischenprodukte intermediär nicht angehäuft werden. Weitere Untersuchungen der Reaktionsprodukte von Cadaverin im zellfreien Extrakt, bei denen schonende Aufschlußverfahren eine Voraussetzung zur Erhaltung des N-hydroxylierenden Enzymsystems sind, sollten sich anschließen. Bei der Suche nach Intermediärprodukten könnte auch der unter 3.3.2. beschriebene Effekt von Nutzen sein: Unter geringer Belüftung war die Arthrobactinsynthese bei gleichbleibender Lysindecarboxylase-Aktivität vermindert. Da vermutlich das N-hydroxylierende Enzymsystem aufgrund des fehlenden Sauerstoffs nicht induziert wird, sollte es unter diesen Bedingungen zu einer Anhäufung von Intermediärprodukten kommen.

Von besonderem Interesse könnte in künftigen Versuchen zur Biosynthese von citronensäurehaltigen Sideraminen die Aktivierung von Citrat zur Bildung der Peptidbindung sein. Geeignete Voraussetzung für solche Untersuchungen wäre ein System, bei dem der sideraminbildende Organismus Citrat ohne Induktion transportiert.

In unseren Versuchen konnte Citronensäure in Arthrobactin nicht eingebaut werden. Dies wurde durch Untersuchung des Transportes erklärt: Citronensäure wird erst nach Induktion eines Transportsystems von den Zellen aufgenommen.
Die großen taxonomischen Unterschiede zwischen grampositiven Organismen, zu denen Arthrobacter und die Streptomyceten zählen, einerseits und den Enterobacteriaceen andererseits lassen Analogieschlüsse nicht zu. Trotzdem wurde die Möglichkeit erwogen, daß K. pneumoniae der für Untersuchungen der Citrat-Aktivierung geeignetere Organismus ist. Wachstum auf Citrat wird für K. pneumoniae als Stammeigenschaft beschrieben (Bergey, 1974) und durch

unseren Versuch bestätigt (3.2.4.).
Für Transport- und Einbauversuche wäre jedoch der regulatorische Einfluß von Alkalimetallen zu bestimmen. Verschiedene Arbeitsgruppen stellten fest, daß bei Organismen, die alle, wie auch früher der von uns verwendete Stamm ATCC 25304, als Aerobacter aerogenes bezeichnet wurden, der Citrat-Transport unterschiedlich durch Kalium- und Natriummangel gehemmt werden kann (O'Brien und Stern, 1969; Eagon und Wilkerson, 1972; Wilkerson und Eagon, 1974).

Eine zusätzliche Schwierigkeit liegt für Untersuchungen der Citrat-Aktivierung bei K. pneumoniae mit Sicherheit in der Funktion des Citrates als Eisen-Ionophor und in der Bildung von Enterochelin. Citrat reprimiert Enzyme der Enterochelinbiosynthese in Aerobacter aerogenes 62-1, einer Mutante des von uns benützten Stammes ATCC 25304 (Young et al., 1967).
Daher wäre eine Untersuchung der Citrat-Aktivierung bei der Biosynthese citronensäurehaltiger Sideramine nur mit Mutanten möglich.
Ein Citrat-aktivierendes Enzym wurde bis jetzt noch nicht isoliert, jedoch wäre ein von Spector (1972) beschriebener Mechanismus denkbar, bei dem enzymgebundenes Citryl-CoA als Zwischenprodukt nachgewiesen werden konnte (Eggerer und Remberger, 1963).

Durch den guten Einbau von Cadaverin in Arthrobactin wurde die Bestimmung der Lysindecarboxylase-Aktivität interessant. Schon in vivo Versuche bestätigten diese Enzymaktivität in A. pascens. In K. pneumoniae, bei dessen Aerobactin-Biosynthese nach unseren Vorstellungen das Lysin vor Verknüpfung mit der Citronensäure nicht decarboxyliert wird, konnte auch nur eine minimale Lysindecarboxylase-Aktivität nachgewiesen werden.
Auch ließ sich in vivo schon der regulatorische Einfluß

von Eisen(III)-ionen bei A. pascens bestimmen. In eisenhaltigem Medium gewachsene Zellen zeigten keine Lysindecarboxylase-Aktivität. Ob Eisenionen die Lysindecarboxylase direkt hemmen, konnte in diesem in vivo Test nicht geklärt werden. Daher wurden Untersuchungen über die Eigenschaften des Enzyms in zellfreien Extrakten angeschlossen.

Nach Zellaufschluß ließ sich die Lysindecarboxylase als lösliches Enzym mit einer für die Arthrobactinsynthese ausreichenden Aktivität nachweisen. Die pH-Abhängigkeit zeigte eine typische Glockenkurve mit nur einem pH-Optimum bei 7,6 (Abb. 8).
Im Gegensatz dazu wurden von Leifer und Maas (1973) bei E. coli zwei Lysindecarboxylase-Aktivitäten mit pH-Optima bei pH 6,0 und 9,0 gefunden. Die Untersuchungen der Putrescinbiosynthese zeigten, daß in E. coli zwei Ornithin- wie auch zwei Arginindecarboxylasen vorhanden sind. Sie unterscheiden sich in ihren pH-Optima, der Hitzestabilität und den Bedingungen, unter denen sie gebildet werden (Morris und Pardee, 1965; 1966; Blethen et al., 1968; Boeker et al., 1971; Wu und Morris, 1973a,b; Applebaum et al., 1975). Nach Meinung von Morris und Fillingame (1974) kommen den Decarboxylasen, die bei neutralem pH ihr Optimum zeigen, biosynthetische Funktionen zu, während die induzierbaren Enzyme mit einem pH-Optimum im sauren Bereich katabolische Aufgaben haben. Über eine physikalische Trennung der von Leifer und Maas in Escherichia coli gefundenen Lysindecarboxylasen wurde noch nicht berichtet.
Aus Bacterium cadaveris (Soda und Moriguchi, 1969) und Escherichia coli (Sabo et al., 1974a,b) wurden induzierbare Lysindecarboxylasen isoliert, die beide pH-Optima von 5,8 zeigten. Bei dem von uns untersuchten Enzym handelt es sich

nach der vorgeschlagenen Einteilung daher wahrscheinlich um das biosynthetisch wirksame Enzym.

Die Untersuchungen zum Einfluß von Sauerstoffmangel auf die Enzymaktivität (Tabelle 13) zeigten, daß selbst in gering belüfteten Kulturen, die schlecht wuchsen und kein Sideramin bildeten, Lysin bei Zugabe zum zellfreien Extrakt decarboxyliert wurde. Der Sauerstoffpartialdruck hatte in dem untersuchten Bereich keinen Einfluß auf die Lysindecarboxylase-Aktivität. Die verminderte Sideraminsynthese im Kolben mit 100 ml Medium ohne Schikane (B) gegenüber dem mit 150 ml und Schikane (C) deutet darauf hin, daß das niedrigere Sauerstoffangebot zu einer Beeinträchtigung der Sideraminsynthese führt. Im Falle der Pulcherriminsäure-Biosynthese hat Plattner (1976) nachweisen können, daß die N-Hydroxylierung von cyclo-L-Leucyl-L-leucyl durch hohen Sauerstoffpartialdruck induzierbar ist. Auch unter unseren Versuchsbedingungen sollte der Nachweis geführt werden, ob die Sideraminbildung durch eine Beeinträchtigung des N-hydroxylierenden Enzymsystems reduziert ist.

Die Lysindecarboxylase kann auch nicht durch Lysin induziert werden, und eine bei Wachstum in eisenhaltigem Medium reduzierte Enzymaktivität beruht nicht auf einer durch Eisenionen inhibierten Lysinbiosynthese.
Ob eine Produkthemmung wie bei Ornithin- und Arginindecarboxylase durch Putrescin, Spermidin, Cadaverin und andere Diamine erfolgt, wie von Morris et al. (1970) beschrieben wurde, sollten künftige Versuche zeigen.

Die Beobachtung, daß bei Zusatz von Eisenionen zum Medium die in ganzen Zellen nachweisbare Lysindecarboxylase-Aktivität vermindert ist (Tabelle 11), konnte durch in vitro Experimente bestätigt werden (Abb. 10).

Bei niedriger Eisenkonzentration im Medium findet man eine hohe Enzym-Aktivität nach Aufschluß der Zellen, bei Zunahme der Eisenionen sinkt der Umsatz des Lysins im Test in einem Konzentrationsbereich zwischen 5×10^{-7}M und 5×10^{-6}M $FeCl_3$ vollständig ab. Dieses eindeutige Ergebnis stützt den aus unseren Einbauversuchen gezogenen Schluß, daß der Hauptweg der Arthrobactinsynthese über die Lysindecarboxylierung als erstem Schritt läuft. Vielfach erfolgt ja die Regulation eines Biosyntheseweges am ersten Enzym nach der Abzweigung aus dem Intermediärstoffwechsel. Das gilt auch für Enzyme, die durch Eisenionen reguliert werden. So beobachteten Brot und Goodwin (1968) im Bereich von 1×10^{-7}M/$1{,}5 \times 10^{-6}$M $FeSO_4$ einen steilen Aktivitätsabfall der an der Enterochelinbildung beteiligten Dihydroxybenzoylserinsynthetase in E. coli. Ebenso war die Bildung von Dihydroxybenzoesäure in Bacillus subtilis bei Wachstum des Organismus auf eisenhaltigem Medium bei zunehmender Konzentration ($3{,}7 \times 10^{-7}$M bis $7{,}4 \times 10^{-6}$M $FeSO_4$) bis auf ein Minimum reduziert (Byers und Lankford, 1968).
Die Arbeitsgruppe von Young wies eine Repression des Dihydroxybenzoesäure-synthetisierenden Enzymsystems in Aerobacter aerogenes bei Wachstum in eisenhaltigem Medium (10^{-5}M/10^{-4}M $FeSO_4$) nach (Young et al., 1967, Young und Gibson, 1969).

Aus dem Diagramm (Abb. 10) ist auch zu ersehen, daß die Lysindecarboxylase bei einer Eisen(III)-ionen-Konzentration von 2×10^{-6}M noch zu 50% aktiv war, während keine Sideraminbildung mehr erfolgte. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die Lysindecarboxylase nicht das einzige Enzym ist, dessen Aktivität durch die Anwesenheit der Eisenionen beeinträchtigt wird. Dieses durch geringste Eisenionen-Konzentrationen regulierte

Enzym könnte das nach dem Biosyntheseschema zu fordernde N-hydroxylierende Enzym sein.
Nach welchem Mechanismus die Lysindecarboxylase-Aktivität reguliert wird, ist nicht endgültig geklärt. Vermutlich handelt es sich um eine Repression.

Die Lysindecarboxylase wird auch von Eisen(III)-ionen im Rohextrakt direkt gehemmt (Abb. 10). Dabei sind Konzentrationen erforderlich, die, verglichen mit der in vivo-Hemmung, um zwei Zehnerpotenzen höher liegen. Auch Brot und Goodwin (1968) wiesen in vitro eine unmittelbare Hemmung der Dihydroxybenzoylserin-Synthetase durch eine ebenfalls im Vergleich mit in vivo Experimenten um das Hundertfache erhöhte Eisen-Konzentration nach.

Die Untersuchungen der Sideraminbildung bei S. glaucescens ließen Analogien zur Arthrobactinbildung erkennen. Cadaverin wurde besser eingebaut als Lysin, wenn man berücksichtigt, daß nur das L-Isomere vom Organismus verwertet wird. Die Decarboxylierung wurde auch durch die in vivo Untersuchungen des Enzyms bestätigt (Tabelle 12). Dabei konnte gezeigt werden, daß Wachstum in eisenhaltigem Medium die Lysindecarboxylaseaktivität hemmt, wenn auch nicht annähernd vollständig, wie es unter gleichen Versuchsbedingungen bei A. pascens der Fall war.

Für den schlechten Einbau der Bernsteinsäure in Ferrioxamin E können die gleichen Ursachen vorliegen wie beim Einbau der Citronensäure in A. pascens, was in diesem Falle ein Hinweis auf taxonomische Verwandtschaft sein könnte und für weitere Untersuchungen an dem strukturell einfacheren Arthrobactin spricht.
In Ferrioxamin E kommt der Baustein N-Succinyl-diaminopentan vor, der sich formal durch CO_2-Abspaltung

aus Succinyl-diaminopimelinsäure, einem Intermediär-
produkt der Lysinbiosynthese ableiten läßt. Die
Hypothese, daß die Ferrioxamin-Biosynthese bei der
Succinyl-diaminopimelinsäure vom Primärstoffwechsel
abzweigt, scheint nicht mehr wahrscheinlich.
Nach unseren Untersuchungen zur Bildung von
Ferrioxamin E kann angenommen werden, daß das
Tripeptid ebenfalls über Lysin und sein Decarboxylierungs-
produkt Cadaverin gebildet wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Biosynthese des Arthrobactins wurde in vivo durch Einbau radioaktiv markierter Vorstufen untersucht. Bei einem Vergleich von Cadaverin und Lysin zeigte sich, daß Cadaverin besser eingebaut wird als Lysin. Von einem racemischen Lysin-Gemisch kann nur das L-Isomere inkorporiert werden. Nach Inkubation von Zellen mit ε-N-Acetyl-lysin konnte radioaktive Markierung im Sideramin nachgewiesen werden, doch war sie geringer als die des vergleichsweise eingebauten Lysins.

Bei in vitro Inkubation mit markiertem Cadaverin ließ sich als Hauptprodukt keines der auf dem Biosyntheseweg möglichen Derivate nachweisen.

Citronensäure wurde von Arthrobacter pascens nicht in Arthrobactin eingebaut. Im nicht-induzierten Zustand wird diese Verbindung nicht transportiert.

Die Lysindecarboxylase-Aktivität wurde nach einer neu entwickelten Methode quantitativ durch Messung von radioaktiv markiertem CO_2 in vivo und in vitro bestimmt. Sie zeigte ein pH-Optimum von 7,6 und setzte ε-N-Acetyl-lysin als Substrat um.
Unter geringem Sauerstoffpartialdruck ist die Lysindecarboxylase aktiv, während die Arthrobactinsynthese reduziert ist.
Die Lysindecarboxylase ist durch Eisen(III)-ionen in vivo und in vitro hemmbar. In vitro ließ sich eine Repression nach Wachstum der Zellen in eisenhaltigem Medium in einem Konzentrationsbereich zwischen 5×10^{-7}M und 5×10^{-6}M $FeCl_3$ nachweisen. Bei direkter Zugabe der Eisenionen zum Test wurde eine langsame Abnahme der Enzymaktivität bei höheren Eisenionen-

Konzentrationen beobachtet. Eine 50%ige Hemmung erfolgte hier erst bei einer Fe^{3+}-Konzentration von 3×10^{-4}M. Wird die Enzymaktivität durch Eisen(III)-ionen reprimiert, so läßt sich durch Zugabe von Lysin keine Lysindecarboxylase induzieren.
Bei Klebsiella pneumoniae konnte nur eine geringfügige Lysindecarboxylase-Aktivität nachgewiesen werden.

Streptomyces glaucescens baut Cadaverin in Ferrioxamin E besser ein als Lysin. Auch der Lysindecarboxylasetest war in vivo positiv, die Aktivität nach Wachstum der Zellen auf eisenhaltigem Medium reduziert.
Ein Einbau von Bernsteinsäure erfolgte nur zu einem sehr geringen Prozentsatz.

6. LITERATUR

Anke, H., Anke, T. & Diekmann, H. (1973): Biosynthesis of sideramines in fungi. Fusigen synthetase from extracts of Fusarium cubense.
FEBS letters 36, 323-325.

Anke, T. (1973): Versuche zur Synthese von Peptid- und Esterbindungen bei cyclischen Trihydroxamsäuren (Sideraminen) und Rhodotorulasäure bei Pilzen in vivo und in vitro.
Dissertation Universität Tübingen.

Anke, T. & Diekmann, H. (1972): Biosynthesis of sideramines in fungi. Rhodotorulic acid synthetase from extracts of Rhodotorula glutinis.
FEBS letters 27, 259-262.

Applebaum, D., Sabo, D.L., Fischer, E.H. & Morris, D.R. (1975): Biodegradative ornithine decarboxylase of Escherichia coli. Purification, properties, and pyridoxal 5'-phosphate binding.
Biochemistry 14, 3675-3681.

Bachrach, U. (1973): Function of naturally occurring polyamines.
Academic Press, New York und London.

Bergey's manual of determinative bacteriology (1957), 7. Aufl., (R.S. Breed, E.G.D. Murray & N.R. Smith, eds.),
(1974), 8. Aufl., (R.E. Buchanan & N.E. Gibbons, eds.)
The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

Bickel, H., Bosshardt, R., Gäumann, E., Reusser, P., Vischer, E., Voser, W., Wettstein, A. & Zähner, H. (1960a): Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 26. Mitt. Über die Isolierung und Charakterisierung der Ferrioxamine A-F, neuer Wuchsstoffe der Sideramin-Gruppe.
Helv. Chim. Acta 43, 2118-2128.

Bickel, H., Gäumann, E., Keller-Schierlein, W., Prelog, V., Vischer, E., Wettstein, A. & Zähner, H. (1960b): Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 22. Mitt. Über eisenhaltige Wachstumsfaktoren, die Sideramine, und ihre Antagonisten, die eisenhaltigen Antibiotika Sideromycine.
Experientia 16, 129-133.

Blethen, S.L., Boeker, E.A. & Snell, E.E. (1968): Arginine decarboxylase from Escherichia coli. I. Purification and specifity for substrates and coenzyme.
J. Biol. Chem. 243, 1671-1677.

Boeker, E.A., Fischer, E.H. & Snell, E.E. (1971): Arginine decarboxylase from Escherichia coli. IV. Structure of the pyridoxal phosphate binding site.
J. Biol. Chem. 246, 6776-6781.

Boeker, E.A. & Snell, E.E. (1972): Amino acid decarboxylases, The Enzymes, 6, 217-253.

Brot, N., Goodwin, J. & Fales, H. (1966): In vivo and in vitro formation of 2,3-dihydroxybenzoylserine by Escherichia coli K 12.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 25, 454-461.

Brot, N. & Goodwin, J. (1968): Regulation of 2,3-dihydroxy-benzoylserine synthetase by iron.
J. Biol. Chem. 243, 510-513.

Bryce, G.F. (1973): Studies on the enzymes involved in the biosynthesis of cyclo-tris(N-2,3-dihydroxy-benzoyl-L-seryl) in Escherichia coli: Kinetic properties of the L-serine activating enzyme.
J. Bacteriol. 116, 790-796.

Bryce, G.F. & Brot, N. (1972): Studies on the enzymatic synthesis of the cyclic trimer of 2,3-dihydroxy-N-benzoyl-L-serine in Escherichia coli.
Biochemistry 11, 1708-1715.

Bryce, G.F., Weller, R. & Brot, N. (1971): Studies on the enzymatic synthesis of 2,3-dihydroxy-N-benzoyl-L-serine in Escherichia coli.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, 871-879.

Bu'Lock, J.D. (1965): The biosynthesis of natural products. McGraw-Hill Publishing Company Limited.
New York, Toronto, Sidney.

Byers, B.R. & Lankford, C.E. (1968): Regulation of synthesis of 2,3-dihydroxyvenzoic acid in bacillus subtilis by iron and a biological secondary hydroxamate.
Biochim. Biophys. Acta 165, 563-566.

Clark, J.M. (1964): Experimental Biochemistry
(W.H. Freeman and Company), p. 95

Clarke, A.J. & Mann, P.J.G. (1959): Plant enzyme reactions leading to the formation of heterocyclic compounds.
3. Plant amine oxidase and the formation of pyrrolidine and piperidine alkaloids.
Biochem.J. 71, 596-609.

Cohen, S.S. & Lichtenstein, J. (1960): Polyamines and ribosome structure.
J. Biol. Chem. 235, 2112-2116.

Costin, I.D. (1968): zitiert nach: Mikrobiologisches Handbuch, E. Merck, Darmstadt, pp. 207-209.

Cox, G.B., Gibson, F., Luke, R.K.J., Newton, N.A., O'Brien, I.G. & Rosenberg, H. (1970): Mutations affecting iron transport in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 104, 219-226.

Davis, W.B., McCauley, M.J. & Byers, B.R. (1971): Iron requirements and aluminium sensivity of an hydroxamic acid-requiring strain of Bacillus megaterium.
J. Bacteriol. 105, 589-594.

De Sa, R.J. & Brantner, R. (1972): Putrescine oxidase from Micrococcus rubens. Purification and properties of the enzyme.
J. Biol. Chem. 247, 5527-5534.

Diekmann, H. (1974): Siderochromes (Iron (III)-trihydroxymates), in CRC Handbook of Microbiology (West, R.C., Laskin, A.J. & Lechevalier, H., eds.) Vol. 3, Chemical Rubber Co, Cleveland, pp. 449-457.

Dubin, D.T. & Rosenthal, S.M. (1960): The acetylation of polyamines in Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 235, 776-782.

Eagon, R.G. & Wilkerson, L.S. (1972): A potassium-dependent citric acid transport system in Aerobacter aerogenes.
Biophys. Biochem. Res. Comm. 46, 1944-1950.

Eggerer, H. & Remberger, U. (1963): Zum Mechanismus der biologischen Umwandlung von Citronensäure. II. Die Rolle von Citryl-Coenzym A in der Citrat-synthase-reaktion.
Biochem. Z. 337, 202-223.

Emery, T. (1966): Initial steps in the biosynthesis of ferrichrome. Incorporation of δ-N-hydroxyornithine and δ-N-acetyl-δ-N-hydroxyornithine.
Biochemistry 5, 3694-3701.

Fastrich, D. (1974): Untersuchungen zur Regulation der Sideraminbildung und zum Eiseneinbau aus Sideraminen in Protoporphyrin IX bei Neurospora crassa arg-5 ota aga.
Dissertation Universität Tübingen.

Fries, J. & Getrost, H. (1975): Organische Reagenzien für die Spurenanalyse. E. Merck, Darmstadt,
pp. 129-130.

Gibson, F. & Magrath, D.I. (1969): The isolation and characterisation of a hydroxamic acid (Aerobactin) formed by Aerobacter aerogenes 62-1.
Biochim. Biophys. Acta 192, 175-184.

Hantke, K. & Braun, V. (1975): Membrane receptor dependent iron transport in Escherichia coli.
FEBS letters 49, 301-305.

Hasse, K. & Maisack, H. (1955): Die Reaktionsprodukte der enzymatischen Oxydation von Putrescin und Cadaverin.
Biochem. Z. 327, 296-304.

Hesseltine, C.W., Whitehill, A.R., Pidacks, C. Hagen, M.T., Bohonos, N., Hutchings, B.L. & Williams, J.H. (1953): Coprogen, a new growth factor present in dung, required by Pilobolus species.
Mycologica 45, 7-19.

Horecker, B.L., Thomas, J. & Monod, J. (1960): Galactose transport in Escherichia coli. I. General properties as studies in a galactokinaseless mutant.
J. Biol. Chem. 235, 1580-1585.

Horowitz, N.H., Charlang, G., Horn, G. & Williams, N.P. (1976): Isolation and identification of the conidial germination factor of Neurospora crassa.
J. Bacteriol. 127, 135-140.

Keller-Schierlein, W. & Prelog, V. (1961): Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 30. Mitt. Über das Ferrioxamin E, ein Beitrag zur Konstitution des Nocardamins.
Helv. Chim. Acta 44, 1981-1985.

Keller-Schierlein, W., Prelog, V. & Zähner, H. (1964): Siderochrome (Natürliche Eisen(III)-trihydroxamat-Komplexe).
Fortschr. Chem. Org. Naturst. 22, 279-322.

Kim, K. & Tchen, T.T. (1971): Diamine-α-ketoglutarate aminotransferase (Escherichia coli).
Meth. Enzymol. 17B 812-815.

Knüsel, F. & Nüesch, J. (1965): Mechanism of action of sideromycins.
Nature 206, 674-676.

Kobayashi, Y. & Harris, W.G. (ohne Jahresangabe):
LSC Application notes.
10. Extraction of tritiated amino acids from silica gel.

Koser, S.A. (1923,1924): zitiert nach: Mikrobiologisches Handbuch, E. Merck, Darmstadt.
pp. 110-111.

Läuger, P. (1972): Carrier-mediated ion transport.
Science 178, 24-30.

Leifer, Z. & Maas, W.K. (1973): Studies on the regulation of lysine decarboxylase by polyamines.
Fed. Proc. 32, 659.

Leong, J. & Neilands, J.B. (1976): Mechanisms of siderophore iron transport in enteric bacteria.
J. Bacteriol. 126, 823-830.

Linke, W.D., Crueger, A. & Diekmann, H. (1972): Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 106. Mitt. Zur Konstitution des Terregens-Faktors.
Arch. Mikrobiol 85, 44-50.

Lochhead, A.G. & Burton, M.O. (1953): An essential bacterial growth factor produced by microbial synthesis.
Can. J. Bot. 31, 7-22.

Luckey, M. & Neilands, J.B. (1976): Iron transport in Salmonella typhimurium LT-2: Prevention, by ferrichrome, of adsorption of bacteriophages ES 18 and ES 18.h1 to a common cell envelope receptor.
J. Bacteriol. 127, 1036-1037.

Martin, R.G. & Ames, B.N. (1962): The effect of polyamines and of poly U size on phenylalanine incorporation. Proc. Natl. Acad. Sci. US. 48, 2171-2178.

McLaughlin, S. & Eisenberg, M. (1975): Antibiotics and membrane biology. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 4, 335-366.

Meister, A. (1965): IV. General biochemical and physiological considerations, G. Decarboxylation, in: Biochemistry of the amino acids, 2. Aufl. Academic Press, New York und London, pp. 332-338.

Mikrobiologisches Handbuch. E. Merck, Darmstadt.

Moller, M.L. & Kim, K. (1965): Effects of putrescine and magnesium on the ribosomes of a pseudomonas Biochem. Biophys. Res. Comm. 20, 46-52.

Monod, J., Cohen-Bazire, G. & Cohn. M. (1951): Sur la biosynthèse de la β-galactosidase (Lactase) chez Escherichia coli. La spécifité de l'induction. Biochim. Biophys. Acta 7, 585-599.

Morris, D.R. & Pardee, A.B. (1965): A biosynthetic ornithine decarboxylase in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Comm. 20, 697-702.

Morris, D.R. & Pardee, A.B. (1966): Multiple pathways of putrescine biosynthesis in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 241, 3129-3135.

Morris, D.R., Wu, W.H., Applebaum, D. & Koffron, K.L. (1970): Regulatory patterns in putrescine biosynthesis in Escherichia coli. Ann. N.Y. Acad. Sci. 171, 968-976.

Morris, D.R. & Fillingame, R.H. (1974): Regulation of amino acid decarboxylation. Ann. Rev. Biochem. 43, 303-325.

Müller, A. & Zähner. H. (1968): Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 65. Mitt. Ferrioxamine aus Eubacteriales. Arch. Mikrobiol. 62, 257-263.

Mullis, K.B., Pollack, J.R. & Neilands,J.B. (1971): Structure of schizokinen, an iron-transport compound from Bacillus megaterium. Biochemistry 10, 4894-4898.

O'Brien, I.G. & Gibson, F. (1970): The structure of Enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 215, 393-402.

O'Brien, I.G., Cox, G.B. & Gibson, F. (1970): Biologically active compounds containing 2,3-dihydroxybenzoic acid and serine formed by Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 201, 453-460.

O'Brien, I.G., Cox, G.B. & Gibson, F. (1971): Enterochelin hydrolysis and iron metabolism in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 237, 537-549.

O'Brien, R.W. & Stern, J.R. (1969): Role of sodium in determing alternate pathways of aerobic citrate catabolism in Aerobacter aerogenes.
J. Bacteriol. 99, 389-394.

Osterhout, W.J. (1933): Permeability in large plant cells and in models.
Ergeb. Physiol. 35, 967-1021.

Padmanaban, G. & Sarma, P.S. (1966): Cobalt toxicity and iron metabolism in Neurospora crassa.
Biochem. J. 98, 330-334.

Paik, W.K. & Kim, S. (1964): Enzymic synthesis of ε-N-Acetyl-L-lysine.
Arch. Biochem. Biophys. 108, 221-229.

Plattner, H. (1976): Untersuchung der Biosynthese von Pulcherriminsäure in zellfreien Extrakten von Candida pulcherrima.
Dissertation Universität Tübingen.

Pollack, J.R. & Neilands, J.B. (1970): Enterobactin, an iron transport compound from Salmonella typhimurium.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 38, 989-992.

Pressman, B.C. (1973): Properties of ionophores with broad range cation selectivity.
Fed. Proc. 32, 1698-1703.

Raina, A. & Cohen, S.S. (1966): Polyamines and RNA synthesis in a polyauxotrophic strain of Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. US. 55, 1587-1593.

Raina, A., Jansen, M. & Cohen, S.S. (1967): Polyamines and the accumulation of ribonucleic acid in some polyauxotrophic strains of Escherichia coli. J. Bacteriol. 94, 1684-1696.

Ratledge, C., Macham, L.P., Brown, K.A. & Marshall, B.J. (1974): Iron transport in Mycobacterium smegmatis: a restricted role for salicylic acid in the extracellular environment. Biochim. Biophys. Acta 372, 39-51.

Rosenberg, H. & Young, I.G. (1974): Iron transport in enteric bacteria, in: Microbial iron metabolism, (J.B.Neilands, ed.) Academic Press, New York und London, pp. 67-82.

Rothstein, M. (1965): Intermediates of lysine dissimilation in the yeast, Hansenula saturnus. Arch. Biochem. Biophys. 111, 467-476.

Sabo, D.L., Boeker, E.A., Byers, A., Waron, H. & Fischer, E.H. (1974a): Purification and physical properties of inducible Escherichia coli lysine decarboxylase. Biochemistry 13, 662-670.

Sabo, D.L. & Fischer, E.H. (1974b): Chemical properties of Escherichia coli lysine decarboxylase including a segment of its pyridoxal 5'-phosphat binding site. Biochemistry 13, 670-676.

Schafft, M. (1973): Versuche zur Biosynthese von Arthrobactin. Diplomarbeit Universität Tübingen.

Silver, S., Wendt, L., Bhattacharyya, P. & Beauchamp , R.S. (1970): Effects of polyamines on membrane permeability.
Ann. NY. Acad. Sci. 171, 838-862.

Simmons, J.S. (1926): zitiert nach: Mikrobiologisches Handbuch, E. Merck, Darmstadt, pp. 304-305.

Snow, G.A. (1970): Mycobactins: Iron-chelating growth factors from Mycobacteria.
Bacteriol. Rev. 34. 99-125.

Soda, K. & Moriguchi, M. (1969): Crystalline lysine decarboxylase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 34, 34-39.

Spector, L.B. (1972): Citrate cleavage and related enzymes.
The Enzymes, 7, 357-389.

Suzuki, T. & Tomita, F. (1976)
zitiert nach Chemical Abstracts 84, 149225.

Tabor, C.W. (1968): The effect of temperature on the acetylation of spermidine.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 339-342.

Tabor, H., Rosenthal, S.M. & Tabor, C.W. (1958): The biosynthesis of spermidine and spermine from putrescine an methionine.
J. Biol. Chem. 233, 907-914.

Tabor, H. & Tabor, C.W. (1964): Spermidine, spermine and related amines.
Pharmacol. Rev. 16, 245-300.

Tabor, H. & Tabor, C.W. (1972): Biosynthesis and metabolism of 1,4-diaminobutane, spermidine, spermine and related amines.
Adv. Enzymol. 36, 203-268.

Tanaka, H. & Soda, K. (1974): Enzymatic N-acetylation of lysine analogs.
J. Biol. Chem. 249, 5285-5289.

Tateson, J.E. (1970): Early steps in the biosynthesis of mycobactins P and S.
Biochem. J. 118, 747-753.

Vu, T.M.C. (1976): Sideramin-auxotrophe Mutanten von Arthrobacter pascens ATCC 13346
Diplomarbeit Technische Universität, Tierärztliche und Medizinische Hochschulen Hannover.

Warburg, O. & Christian, W. (1941/1942): Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase.
Biochem. Z. 310, 384-421.

Wilkerson, L.S. & Eagon, R.G. (1974): Effect of sodium on the transport and utilisation of citric acid by Aerobacter (Enterobacter) aerogenes.
J. Bacteriol. 120, 121-124.

Winkelmann, G. & Zähner, H. (1973): Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 115. Mitt. Eisenaufnahme bei Neurospora crassa. I. Zur Spezifität des Eisentransportes.
Arch. Mikrobiol. 88, 49-60.

Winkelmann, G., (1974): Metabolic products of microorganisms, 132. Uptake of iron by Neurospora crassa. III. Iron transport studies with ferrichrome-type compounds.
Arch. Microbiol. 98, 39-50.

Wipf, H.-K., Pache, W., Jordan, P. Zähner, H., Keller-Schierlein, W. & Simon, W. (1969): Mechanism of alkali cation transport in bulk membranes using macrotetrolide antibiotics.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 387-393.

Wu, W.H. & Morris, D.R. (1973a): Biosynthetic arginine decarboxylase from Escherichia coli. Purification and properties.
J. Biol. Chem. 248, 1687-1695.

Wu, W.H. & Morris, D.R. (1973b): Biosynthetic arginine decarboxylase from Escherichia coli. Subunit interactions and the role of magnesium ion.
J. Biol. Chem. 248, 1696-1699.

Yamada, H. (1971): Putrescine oxidase (Micrococcus rubens), Meth. Enzymol. 17 B, 726-730.

Young, I.G., Cox, G.B. & Gibson, F. (1967): 2,3-dihydroxybenzoate as a bacterial growth factor and its route of biosynthesis.
Biochim. Biophys. Acta 141, 319-331.

Young, I.G. & Gibson, F. (1969): Regulation of the enzymes involved in the biosynthesis of 2,3-dihydroxybenoic acid in Aerobacter aerogenes and Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 177, 401-411.

Young, I.G., Langman, L., Luke, R.K.J. & Gibson, F. (1971): Biosynthesis of the iron- transport compound Enterochelin: mutants of Escherichia coli unable to snthesize 2,3-dihydroxybenzoate. J. Bacteriol. 106, 51-57.

Zähner, H. (1969): Antibiotika und Ionentransport. Vortrag. Münster, Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie.

Zähner, H., Hütter, R. & Bachmann, E. (1960): Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 23. Mitt. Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Arch. Mikrobiol. 36, 325-349.

Zähner, H., Bachmann. H.E., Hütter, R. & Nüesch, J. (1962): Sideramine, eisenhaltige Wachstumsfaktoren aus Mikroorganismen. Path. Microbiol. 25, 708-730.

Zähner, H., Keller-Schierlein, W., Hütter, R., Hess-Leisinger, K. & Deêr, A. (1963): Stoffwechselprodukte von Mirkoorganismen, 40. Mitt. Sideramine aus Aspergillaceen. Arch. Mikrobiol. 45, 119-135.

Zimmermann, W. & Knüsel, F. (1969): Permeability of Staphylococcus aureus to the sideromycin antibiotic A22765 Arch. Mikrobiol. 68, 107-112.

Lebenslauf

Am 28. Oktober 1946 wurde ich in Bad Hersfeld geboren.
Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule und anschließend das Realgymnasium für Mädchen in Bad Hersfeld, wo ich im Februar 1966 das Abitur bestand.
Ab Sommersemester 1966 studierte ich an der Universität Tübingen im Leibniz-Kolleg und war für das Fach Biochemie immatrikuliert. Den ersten Teil der Diplom-Vorprüfung legte ich im September 1967, den zweiten Teil im Oktober 1970 ab.
Ab Wintersemester 1970 studierte ich Mikrobiologie als Hauptfach und bestand im August 1973 die Diplom-Hauptprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie, organische Chemie und Pharmakologie.

Die vorliegende Arbeit wurde im Oktober 1973 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Diekmann am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I, begonnen und von April 1975 bis September 1976 am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität Hannover durchgeführt.

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, V. Braun, E. Bünning, H. Diekmann, A. Grahle, K.G. Grell, J. Guglielmi, E. Kallee, G. Kortüm, H. Krüger, F. Lingens, W. Loeffler, H. Mauser, H. Metzner, F. Möhres, K. Moerike, E. Müller, W. Nultsch, P. Ohlmeyer, H. Pape, H. Remmer, W. Rüdorff, E.M. Sander, G. Schramm, V. Schwartz, W. Schweizer, B. Schwemmle, W. Seyffert, H. Uehleke, G. Weitzel, U. Weser, H. Zähner.